

**MARTA MARIA KEMP**

**VITAMINA D: A INFLUÊNCIA NA MATRIZ EXTRACELULAR  
DO TECIDO CONJUNTIVO DE SUSTENTAÇÃO DOS  
ÓRGÃOS PÉLVICOS**

Tese apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo – Escola Paulista  
de Medicina, para obtenção do título de  
Doutor em Ciências.

**São Paulo**

**2019**

**MARTA MARIA KEMP**

**VITAMINA D: A INFLUÊNCIA NA MATRIZ EXTRACELULAR  
DO TECIDO CONJUNTIVO DE SUSTENTAÇÃO DOS  
ÓRGÃOS PÉLVICOS**

Tese apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo – Escola Paulista  
de Medicina, para obtenção do título de  
Doutor em Ciências.

**Orientador:** Prof. Dr. Manoel João Batista Castello Girão

**Coorientadora:** Profa. Dra. Helena Bonciani Nader

**São Paulo  
2019**

Kemp, Marta Maria

**Vitamina D: a influência na matriz extracelular do tecido conjuntivo de sustentação dos órgãos pélvicos.** / Marta Maria Kemp – São Paulo, 2019.

xvii, 120f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Ginecologia.

Título em inglês: Vitamin D: the influence in the extracelular matrix of the pelvic floor connective tissue.

Palavras-chave: 1. Matriz extracelular. 2. Prolapso genital. 3. Estudo em animais. 4. Biologia molecular. 5. Terapia hormonal.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**

**ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**

**Departamento de Ginecologia**

**Chefe do Departamento:**

Prof. Dr. Afonso Celso Pinto Nazario

**Coordenador do Curso de Pós-Graduação:**

Prof. Dr. Manoel João Batista Castello Girão

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**  
**Departamento de Ginecologia**

**Vitamina D: a influência na matriz extracelular dos tecidos  
conjuntivos de sustentação da pelve**

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof. Dr. Manoel João Batista Castello Girão

---

Prof. Dr. Luiz Gustavo Oliveira Brito

---

Profa. Dra. Maria Antonieta Longo Galvão da Silva

---

Profa. Dra. Maria Aparecida da Silva Pinhal

---

Prof. Dr. Nucelio Luiz de Barros Moreira Lemos

**Suplentes:**

Prof. Dr. Manuel de Jesus Simões

Profa. Dra. Aparecida Maria Pacetta

*Aos meus pais, Claudio e Mariza e à minha irmã Ana que,  
com carinho incondicional e modos peculiares de estar nesse mundo,  
me tornaram a pessoa que sou hoje.*

*Ao Prof. Dr. Manoel João Bastista Castello Girão,  
mestre e verzejador do meu escrever.*

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Helena Nader, por ter aberto as portas do seu laboratório a um desconhecido e por ter mostrado, com os olhos marejados e o discurso firme, a intensidade do amor pela pesquisa.

Ao Professor Manuel de Jesus Simões, por ter aberto as portas do seu laboratório e pela disposição para me ajudar nas inquietudes que as imagens incitavam, tendo ele acompanhado também meu pai.

Aos colegas dos laboratórios, com quem pude executar os experimentos, ensinaram e dedicaram parte do seu tempo: Paulo Celso Francote, Adriana Aparecida Ferraz Carbonel, Kátia de Vasconcelos, Luiz Fernando Potugal, Renan Pelluzzi Cavalheiro, Maria Cecília Zorél Meneghetti, Jacilene Barbosa, Gui Mi Ko e funcionários do biotério do INFAR, pelo apoio na manutenção dos animais de experimentação.

Especial agradecimento ao Carlos Modesto Vera Palomino, que me acompanhou durante todo o processo da pesquisa me dedicando seu tempo e atenção enquanto ele mesmo estava imbricado na sua pesquisa de doutorado. Por ter dividido suas ideias que engrandeceram esta pesquisa.

Aos demais familiares e amigos, pela compreensão, incentivo e apoio constante.

## SUMÁRIO

Dedicatória.....	v
Agradecimentos.....	vi
Lista de abreviaturas.....	ix
Lista de figuras.....	x
Lista de tabelas.....	xii
Resumo.....	xiii
Abstract.....	xv
 <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	 <b>1</b>
Uma breve história sobre a Vitamina D.....	2
 <b>2 OBJETIVO.....</b>	 <b>6</b>
 <b>3 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	 <b>8</b>
3.1 O prolapso genital e sua relação com a Vitamina D.....	18
3.2 A Fáscia endopélvica.....	20
3.3 A Matriz Extra Celular.....	24
3.4 Ácido Hialurônico.....	28
3.5 Heparan Sulfato.....	28
3.6 Fibronectina.....	28
3.7 Aglutinina de Germen de Trigo. <i>Wheat Germ Agglutinin (WGA)</i> .....	29
3.8 Vimentina.....	29
3.9 Alfa-actina.....	30
3.10 Elastina.....	31
3.11 Colágeno.....	31
3.12 A Estrutura da Fáscia Endopélvica.....	34
3.13 Modelo animal para estudo dos tecidos de sustentação dos órgãos pélvicos.....	38
3.14 Técnica para análise da arquitetura dos tecidos: geração de segunda harmônica.....	39



<b>4 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
4.1 Sujeitos da Pesquisa.....	44
4.2 Vitamina D e veículo de administração.....	44
4.3 Agrupamento dos animais e administração da droga.....	46
4.4 Avaliação dos animais enquanto vivos.....	46
4.5 Eutanásia e coleta do material.....	46
4.6 Protocolo de descongelamento e preparo do material em Tissue-Tek.....	46
4.7 Protocolo de secção e padronização dos cortes em Tissue-Tek.....	50
4.8 Protocolo de secção e padronização dos cortes em parafina.....	50
4.9 Preparo do material para análise em microscopia.....	51
4.10 Avaliação do ciclo estral.....	53
4.11 Microscopia com geração de segunda harmônica.....	54
4.12 Imunofluorescência.....	55
4.13 Quantificação de sinais.....	56
 <b>5 RESULTADOS.....</b>	 <b>57</b>
5.1 Peso dos animais.....	58
5.2 Avaliação do epitélio vaginal.....	59
5.3 Microscopia com geração de segunda harmônica.....	62
5.4 Picrosirius.....	73
5.5 Imunofluorescência.....	79
 <b>6 DISCUSSÃO.....</b>	 <b>93</b>
 <b>7 CONCLUSÃO.....</b>	 <b>102</b>
 <b>8 ANEXOS.....</b>	 <b>104</b>
 <b>9 REFERÊNCIAS.....</b>	 <b>107</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>25(OH)D</b>	25-hidroxivitamina D
<b>ATFP</b>	Arco tendíneo da fáscia pélvica
<b>CT</b>	Grupo controle
<b>FN</b>	Fibronectina
<b>HE</b>	Hematoxilina Eosina
<b>HS</b>	Heparam sulfato
<b>LC</b>	Ligamento cardinal
<b>LR</b>	Ligamento redondo
<b>LUS</b>	Ligamento uterossacro
<b>mcg</b>	Microgramas
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>MVHI</b>	<i>Modified Vaginal Health Index</i>
<b>ng/mL</b>	Nanograma por mililitro
<b>NIH</b>	National Institute of Health
<b>POP</b>	Prolapso de órgão pélvico
<b>pósM</b>	Pós-menopausa
<b>prém</b>	Pré-menopausa
<b>RH</b>	Reposição hormonal
<b>SMCs</b>	<i>Smooth muscle cells</i>
<b>SHG</b>	<i>Second Harmonic Generation</i>
<b>UI</b>	Unidades internacionais
<b>VDR</b>	<i>Vitamin D receptor</i>
<b>VitD</b>	Vitamina D
<b>WGA</b>	<i>Wheat Germ Agglutinin</i>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 –</b>	Estrutura da molécula de calciferol.....	4
<b>Figura 2 –</b>	Mural pintado em óleo por John Steuart Curry, em 1943, e recebe o nome de “ <i>The Social Benefits of Biochemical Research</i> ” (Os Benefícios Sociais da Pesquisa Bioquímica).....	5
<b>Figura 3 –</b>	Esquema representando a síntese e o metabolismo da vitamina D.....	12
<b>Figura 4 –</b>	Esquema representativo dos proteoglicanos e da distribuição dos componentes da matriz extracelular.....	27
<b>Figura 5 –</b>	Biossíntese e organização hierárquica do colágeno.....	32
<b>Figura 6 –</b>	Geração da segunda harmônica.....	40
<b>Figura 7 –</b>	Esquema representando a configuração da microscopia com SHG.....	41
<b>Figura 8 –</b>	Esquema da amostra tecidual emblocada em Tissue-Tek.....	48
<b>Figura 9 –</b>	Esquema da divisão dos grupos entre controle e tratado e distribuição das amostras conforme as técnicas utilizadas.....	49
<b>Figura 10 –</b>	Tecido emblocado em Tissue-Tek sendo seccionado no criostato.....	50
<b>Figura 11 –</b>	Comparação da medida de diferença do peso de ratas nos grupos controle (CT) e tratado com vitamina D (VIT D).....	59
<b>Figura 12 –</b>	Comparação da medida do epitélio vaginal de ratas corado por HE..	61
<b>Figura 13 –</b>	Epitélio vaginal das ratas conforme fase do ciclo estral.....	61
<b>Figura 14 –</b>	Corte completo em HE em aumento de 2,5X e SHG em aumento de 10X.....	62
<b>Figura 15 –</b>	Corte das regiões do ligamento uterossacro e retrouterina por SHG com aumento de 10X.....	63
<b>Figura 16 –</b>	Imagens por SHG, da região do ligamento uterossacro de ratas com aumento de 10x e de 40x.....	64
<b>Figura 17 –</b>	Imagens por SHG, da região retrouterina de ratas com aumento de 40X. Imagem por microscopia confocal por SHG.....	65
<b>Figura 18 –</b>	Imagens por SHG, com aumento de 40X para análise dos tecidos em diferentes fases do ciclo estral, do grupo controle (duas colunas da esquerda) e do grupo tratado (duas colunas da direita).....	67
<b>Figura 19 –</b>	Imagens por SHG, de cortes de 50 micrômetros, com aumento de 20X, usados para quantificação de sinal de colágeno total.....	69
<b>Figura 20 –</b>	Imagem de corte transversal da cauda de um dos ratos, sob as técnicas SHG e marcação com anticorpos, para comparação dos sinais gerados pela presença de colágeno nos tecidos.....	70
<b>Figura 21 –</b>	Comparação da quantidade de sinal de colágeno por SHG no epitélio vaginal das ratas, conforme ação estrogénica tecidual.....	72
<b>Figura 22 –</b>	Imagem por microscopia convencional, com luz polarizada sobre tecidos corados com picosirius, cortes longitudinais.....	73

<b>Figura 23 –</b>	Imagem por microscopia convencional, com luz polarizada sobre tecidos corados com picrosirius, cortes transversais.....	74
<b>Figura 24 –</b>	Comparação da quantidade de sinal de colágeno I por Picrosirius na lâmina própria do epitélio vaginal de ratas.....	76
<b>Figura 25–</b>	Comparação da quantidade de sinal de colágeno III por Picrosirius na lâmina própria do epitélio vaginal de ratas.....	77
<b>Figura 26 –</b>	Comparação da quantidade de sinal de colágeno total por Picrosirius na lâmina própria do epitélio vaginal de ratas.....	78
<b>Figura 27 –</b>	Imagem de microscopia confocal de alfa-actina por marcação com anticorpos.....	80
<b>Figura 28 –</b>	Imagem de microscopia confocal de vimentina por marcação com anticorpos.....	81
<b>Figura 29 –</b>	Imagem de microscopia confocal de <i>Wheat Germ Agglutinin</i> por marcação com anticorpos.....	83
<b>Figura 30 –</b>	Imagem de microscopia confocal de heparam sulfato por marcação com anticorpos.....	84
<b>Figura 31 –</b>	Imagem de microscopia confocal de fibronectina por marcação com anticorpos.....	86
<b>Figura 32 –</b>	Imagem de microscopia confocal de ácido hialurônico por marcação com proteína de ligação.....	87
<b>Figura 33 –</b>	Imagem de microscopia confocal de elastina por autofluorescência.....	88
<b>Figura 34 –</b>	Imagem de microscopia confocal de fibroblasto por marcação com anticorpos.....	89
<b>Figura 35 –</b>	Imagem de microscopia confocal do ligamento uterossacro.....	91
<b>Figura 36 –</b>	Imagem de microscopia confocal do ligamento uterossacro.....	92

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 –</b>	Níveis séricos de concentração de 25(OH)D e <i>status</i> de saúde.....	15
<b>Tabela 2 –</b>	Recomendações de ingesta adequada de vitamina D.....	16
<b>Tabela 3 –</b>	Valores de referência para vitamina D sérica, conforme as sociedades brasileiras de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial e Endocrinologia e Metabologia.....	16
<b>Tabela 4 –</b>	Estudos que analisam a estrutura da MEC do tecido conjuntivo do assoalho pélvico.....	36
<b>Tabela 5 –</b>	Valores nutricionais presentes na embalagem do óleo de amendoim...	45
<b>Tabela 6 –</b>	Anticorpos utilizados para imunofluorescência e suas diluições.....	53
<b>Tabela 7 –</b>	Parâmetros utilizados na microscopia confocal com geração de segunda harmônica nos cortes de 30 micrometros.....	54
<b>Tabela 8 –</b>	Parâmetros utilizados em microscopia confocal com geração de segunda harmônica nos cortes de 50 micrometros.....	54
<b>Tabela 9 –</b>	Parâmetros utilizados em microscopia confocal para imunofluorescência.....	55
<b>Tabela 10 –</b>	Identificação dos grupos para avaliação do peso em gramas no 18 dia do experimento.....	58
<b>Tabela 11 –</b>	Descrição dos grupos de estudo em relação à medida de peso (gramas).....	58
<b>Tabela 12 –</b>	Descrição dos grupos de estudo em relação a medida do epitélio vaginal.....	60
<b>Tabela 13 –</b>	Descrição dos grupos de estudo em relação a medida do epitélio (micrômetro) corado por HE.....	60
<b>Tabela 14 –</b>	Descrição dos grupos de estudo em relação a quantificação de sinal de colágeno por SHG.....	71
<b>Tabela 15 –</b>	Descrição dos grupos de estudo em relação a medida de quantidade de sinal de colágeno SHG.....	71
<b>Tabela 16 –</b>	Descrição dos grupos de estudo em relação a quantificação de sinal de colágeno por Picrosirius.....	75
<b>Tabela 17 –</b>	Descrição dos grupos de estudo em relação a medida de quantidade de sinal de colágeno I ( <i>picro red</i> ).....	75
<b>Tabela 18 –</b>	Descrição dos grupos de estudo em relação a medida de quantidade de sinal de colágeno III ( <i>picro green</i> ).....	76
<b>Tabela 19 –</b>	Descrição dos grupos de estudo em relação a medida de quantidade de sinal de colágeno total (colágeno I + colágeno III) pela coloração picrosirius.....	77

## RESUMO

Kemp MM. **Vitamina D: a influência na matriz extracelular do tecido conjuntivo de sustentação dos órgãos pélvicos.** São Paulo, 2019. Tese (Doutorado) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo.

**Introdução:** A deficiência da vitamina D tem sido amplamente associada a inúmeras doenças. A maior parte das associações é inferida pelos níveis de 25(OH)D no plasma sanguíneo, substância que não tem relação direta com a atividade dos seus metabólitos – tal como a 1,25(OH)D – já que segue os padrões dos hormônios esteroidais, com “feedbacks” positivos e negativos e outras interações moleculares, em vez de seguir o comportamento das vitaminas. O prolapso de órgão pélvico também foi associado aos baixos níveis séricos da vitamina D e, apesar de o mecanismo exato para esse aumento do risco não ser completamente compreendido, a influência da vitamina D na arquitetura da matriz extracelular (MEC), principal componente do aparato de suporte pélvico e responsável por suas propriedades mecânicas, é uma hipótese. **Objetivos:** O objetivo deste estudo foi examinar a estrutura da matriz extracelular por meio do arranjo das fibras de colágeno - proteína fibrosa mais prevalente dessa matriz -, e outros componentes estruturais da MEC e citoesqueleto da fáscia endopélvica, para observar diferentes padrões morfológicos em animais em regime dietético normal e sob suplementação de vitamina D. A quantificação do colágeno também foi avaliada. **Casística e métodos:** Foram investigadas ratas Wistar adultas (8 semanas de idade com peso entre 200-220g). O grupo tratado recebeu, por gavagem, colecalciferol diluído em óleo de amendoim (na dose de 37.5mcg/Kg/dia, equivalente a 1.500Ui/Kg/dia), e o grupo controle recebeu apenas o óleo, por 18 dias consecutivos. Vinte e quatro horas após o último procedimento de gavagem, foi realizada eutanásia e procedimento cirúrgico com exérese, em bloco, do terço inferior do útero e superior da vagina, base da bexiga com porção proximal da uretra e o tecido conjuntivo adjacente. As amostras foram seccionadas em cortes espessos de 30 e 50 micrômetros e colocadas nas lâminas para avaliação microscópica com a técnica de geração de segunda harmônica (SHG), a qual não requer preparo dos tecidos. Para propósito de interpretação, as ratas foram separadas em grupos, conforme a fase do ciclo estral, alta ação estrogênica (proestro e estro) e baixa ação estrogênica (metaestro e diestro), identificadas por citologia e histologia. As técnicas de Picrosirius para análise do colágeno e marcações com anticorpos para outros componentes estruturais da MEC também foram utilizadas. Os tecidos foram analisados por Microscopia Confocal (TCS SP8 CARS da Leica), utilizando detectores F e Epi-SHG para detecção do sinal de SHG das fibras de colágeno. As imagens são representadas por projeções de intensidade máxima, correspondentes às imagens da série Z, coletadas pela varredura dos tecidos e processadas, utilizando o software Leica LAS AF e, posteriormente, o software ImageJ. **Resultados:** As fibras de colágeno apresentam

padrão ondulado consistente e disposição aleatória no grupo tratado, enquanto o grupo controle assume aparência organizada e orientada, quando sob alta ação estrogênica. O sinal referente a SHG das fibras de colágeno mostrou-se significativamente mais intenso no grupo tratado, comparado ao grupo controle também, quando em um ambiente altamente estrogênico. A marcação de alfa-actina, heparan sulfato e de glicoconjugados contendo resíduos de ácido siálico e de N-acetil-glucosamina) mostraram padrões claramente diferentes entre os grupos controle e tratado. **Conclusões:** Os achados evidenciam diferença na apresentação morfológica da MEC dos animais sob dieta com alta dose de vitamina D, comparados àqueles com ingestão habitual da vitamina, apontando para uma provável mudança nas propriedades mecânicas do tecido e possível interação entre os caminhos metabólicos dos dois hormônios esteroidais, colecalciferol e estrogênio, ao menos no que tange à quantidade de colágeno depositada no tecido. Além do colágeno, outros componentes estruturais da MEC mostraram-se diferentes nos grupos controle e tratado. Administração oral de altas doses de vitamina D altera a organização e a composição da matriz extracelular na fáscia endopélvica, o que pode impactar nas propriedades e resiliência do tecido. Novas pesquisas são necessárias para avaliar o significado clínico do achado, mas mostramos uma relação tangível entre a exposição à vitamina D e a arquitetura das fibras de colágeno na matriz extracelular.

**Palavras-chave:** matriz extracelular, prolapso genital, estudo em animais, biologia molecular, terapia hormonal

## ABSTRACT

Kemp MM. **Vitamin D: the influence in the extracellular matrix of the pelvic floor connective tissue.** São Paulo, 2019. PhD thesis –Paulista Medicine School, Federal University of São Paulo.

**Hypothesis/aims of study:** Vitamin D deficiency is largely spoken of as being associated with several different diseases. Most of the associations are inferred by the levels of 25(OH)D in the plasma, which has no direct correlation to the activity of its active metabolites, i.e. 1,25(OH)D, since it follows the patterns of a steroid hormone, with negative and positive feedbacks and other molecular interactions, instead of behaving as a vitamin. Pelvic organ prolapse has also been linked to lower serum levels of vitamin D, although the exact mechanism for this increase in risk is not totally understood. One of the potential mechanisms for this increased risk is the influence vitamin D has on the architecture of the extracellular matrix (ECM) main component of the structures of the pelvic support apparatus and responsible for its mechanical properties. The aim of this study was to examine the arrangement of collagen fibers, the most prevalent fibrous protein present in the ECM at the endopelvic fascia, and other structural components of the ECM and cytoskeleton of the endopelvic fascia, to capture any different morphological pattern between subjects with a normal diet and those under a vitamin D supplementation. Collagen quantification was also performed. **Study design, materials and methods:** This hypothesis was investigated using female healthy adult Wistar rats (8 weeks old, approximately 200-220g). The treatment group received cholecalciferol diluted in arachid oil by gavage (in the dose 37.5mcg/Kg/day, equivalent to 1,500Ui/Kg/day), and the control group received only the oil, for 18 consecutive days. Twenty-four hours after the last gavage procedure, euthanasia was performed and a surgical procedure was undertaken extracting, as a bloc, the lower third of the uterus with the uterosacral ligament, the upper half of the vagina with the connective tissue surrounding and the bladder with proximal urethra. Samples were immersed in Tissue-Tek and cut in 30 and 50 micrometer thick slices and placed on the sheets for microscopic evaluation with SHG (second harmonic generation) technique, which requires no tissue preparation. For the purpose of interpretation, the rats were also separated into groups according to the estrous phase: high estrogenic influence (proestrus and estrus) and low estrogenic influence (metaestrus and diestrus) identified by cytology and histology under conventional light microscopy. Collagen by Picosirius and antibodies for other extracellular structural components were also performed. Tissues were analyzed using Confocal Microscope (TCS SP8 CARS from Leica) and F and Epi-SHG detectors were used to detect SHG signals from collagen fibers. Images are represented as maximum intensity projections, corresponding to the Z-series of confocal stacks and were collected by tile scan and processed with Leica LAS AF software and, posteriorly, manipulated with ImageJ software. **Results:** We found that collagen fibers have a consistently undulated pattern and more random disposition in the



treated group whereas in the control group it assumes a more taut and oriented appearance, when under high estrogenic influence. The collagen signal from SHG was statistically more intense in the treated group compared to the control group also under a high estrogenic environment. The extracellular components alpha-actin, heparan sulfate and glycoconjugates containing sialic acid and N-acetylglucosamine residues also showed clear different images when comparing control and treated groups. **Conclusion:** These findings suggest that there is a difference in the morphological presentation of the extracellular matrix of subjects under high dose intake of vitamin D compared to subjects under normal intake of the vitamin, pointing to a probable change in the mechanical properties of the tissue and that there might be an interaction of the metabolic pathways of the two steroid hormones cholecalciferol and estrogen at least regarding the amount of collagen deposited in the tissue. Not only the collagen, other components of the ECM presented differently in the treated and control groups. Oral high dose intake of vitamin D changes the framework and composition of the extracellular matrix at the level of the endopelvic fascia, which can impact the properties and resilience of the tissue. In summary, new research are needed in the biomechanical field to approach a clinical significance but we have shown a tangible relation between vitamin D exposure and collagen fiber architecture.

**Keywords:** extracellular-matrix, pelvic organ prolapse, animal study, molecular biology, hormone therapy.

*“A beleza é tudo aquilo que você não dá conta de ver sozinho”*

*Bartolomeu Campos de Queirós*



## **Uma breve história sobre a Vitamina D**

A história da vitamina D começa no século XVII, entre 1645 e 1660, quando Daniel Whistler, nos Países Baixos e Francis Glisson, no Reino Unido, descreveram o raquitismo.<sup>(1)</sup> Em seguida, com a revolução industrial, a doença destacou-se como problema de saúde pública para as crianças das famílias que migravam do campo para ambientes privados da exposição direta à luz solar, nas cidades, evento esse notado em 1822, por Sniadeki. Em 1890, Theobald Palm constatou a mesma relação, observando a distribuição da doença nas diferentes regiões geográficas do mundo.<sup>(2,3)</sup> Mas, a população científica direcionou o olhar para outro aspecto da doença: sua relação com os fatores dietéticos.

Em meados de 1800, Bretonneau conseguiu boa recuperação de pacientes raquíticos a partir da administração de óleo de fígado de bacalhau e seu aluno, Trousseau, atingiu resultados ainda melhores associando o óleo à exposição solar. A doença tornou-se, então, nutricional e a associação à luz foi pouco desenvolvida, nesse momento. Ao final do século XIX, a doença estabeleceu caráter epidêmico no norte europeu e nas cidades industrializadas, do nordeste dos Estados Unidos<sup>(3)</sup> e as pesquisas começaram a florescer.

Após as descobertas dos “fatores nutrientes essenciais”, em 1906, por Sir Frederick Gowland Hopkins<sup>(4)</sup>, Casimir Funk, em 1914, batiza o “fator nutriente” de “vitamina” e afirma que a doença ocorria apenas na ausência ou insuficiência dessa substância dietética.<sup>(5)</sup>

Em 1919, porém, Huldschinsky aproxima-se do conceito atual, demonstrando o aumento da calcificação das epífises de crianças raquíticas a partir da irradiação ultravioleta (com lâmpadas de mercúrio a vapor). Além disso, o pesquisador evidenciou o efeito sistêmico, por meio de documentação de melhora em ambos os braços das crianças que haviam sido irradiadas em apenas um dos membros superiores. Nesse período, outras vitaminas estavam, também, sendo descobertas.<sup>(6)</sup>

---

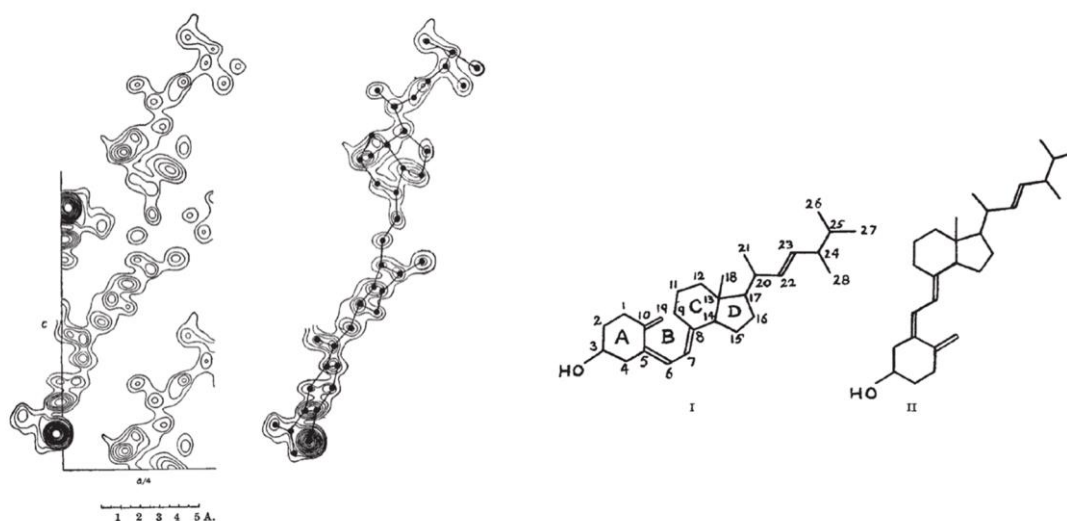
Em 1921, Hess e Unger expuseram crianças raquíticas ao sol, em Nova Iorque e observaram melhora importante, documentada por radiografia.<sup>(2)</sup> O achado estimulou outros autores a iniciarem experimentos com a exposição de alimentos à radiação ultravioleta. Na década de 1920, os grupos de Goldblatt e Katherine Soames, Black et al. e de Hess e Weinstock observaram que alimentos irradiados (levedura, fígado ou pele de ratos raquíticos) também apresentavam propriedades antirraquíticas, quando usados para alimentar ratos doentes.<sup>(1)</sup> Assim, os grupos haviam reproduzido *in vitro* o componente lipossolúvel e o efeito específico da luz solar estava esclarecido: promovia uma mudança química permanente em algum componente da dieta.

Essas descobertas culminaram em recomendações à exposição à luz solar e à fortificação de diversos alimentos, como o leite, e “consequentemente na erradicação do raquitismo como um problema de saúde pública nos Estados Unidos da América e em outros países que adotaram a mesma conduta”<sup>(3)</sup>, porém, sem a determinação de uma relação causal entre a vitamina e a doença. Não havia ainda a consciência de que as vitaminas produzidas pelos grupos de Goldblatt e Katherine Soames (vitamina D<sub>2</sub>) e de Hess e Weinstock (vitamina D<sub>3</sub>) eram diferentes.<sup>(1)</sup>

Adolf Windaus, a partir da irradiação de leveduras, identificou o ergosterol, ao qual deu o nome de vitamina D<sub>1</sub>, acreditando ser um produto único, mas o termo foi abandonado, ao perceberem que havia uma mistura de diversos compostos na preparação irradiada.<sup>(1)</sup>

Em 1932, Windaus et al. e Askew et al., simultaneamente, mas de forma independente identificaram a estrutura química da vitamina D<sub>2</sub>, um secosterol. A vitamina D<sub>3</sub>, por sua vez, foi caracterizada, em 1936, também por Windaus et al.<sup>(1)</sup> Em 1948, Dorothy Crowfoot-Hodgkin evidenciou, por meio de análise cristalográfica estrutural com raio-X, a estrutura da molécula da vitamina D<sub>3</sub>, semelhante à maioria dos outros esteróides<sup>(7)</sup>, representada na figura 1.

---



**Figura 1 – Estrutura da molécula de calciferol.** À esquerda, projeções de densidade eletrônica de moléculas de calciferol cristalizadas, em análise por raios-X; à direita, a representação detalhada das relações estereoquímicas dos átomos dentro da molécula. Adaptada de Crowfoot, 1948.

A vitamina D<sub>2</sub> e seu precursor (ergosterol) são estruturalmente análogos à vitamina D<sub>3</sub> e seu precursor 7-deidrocolesterol. Os dois primeiros não estão presentes e não são sintetizados nos vertebrados, mas são produzidos no reino dos fungos e das plantas; já a vitamina D<sub>3</sub> e o seu precursor foram identificados em humanos, peixes, anfíbios, répteis, pássaros e mamíferos.<sup>(3)</sup>

Nesse período de descobertas, John Steuart Curry, pintor regionalista da cidade de Kansas, nos Estados Unidos criou um mural pintado a óleo, nominado “*The Social Benefits of Biochemical Research*” (Os Benefícios Sociais da Pesquisa Bioquímica) (Figura 2). Segundo ele, a arte deveria ser vista como algo prático ao qual todos deveriam ter acesso. Ele pintava fazendo com que as descobertas científicas parecessem “naturais”. Nesse quadro, vemos representadas as pessoas saudáveis sob a luz do conhecimento e o poder da agricultura e bioquímica em ajudar as pessoas (conceitos de Lauren Kroiz, professora no Departamento de História da Arte na Universidade de Madison).



**Figura 2 – Os benefícios sociais da pesquisa bioquímica.** A imagem representa um grande mural pintado em óleo por John Steuart Curry, em 1943, e recebe o nome de “*The Social Benefits of Biochemical Research*” (Os Benefícios Sociais da Pesquisa Bioquímica). As pessoas e animais à esquerda mostram os efeitos da má nutrição, incluindo as pernas arqueadas de um menino com raquitismo clássico. À direita, pessoas e animais tornam-se saudáveis através dos benefícios da pesquisa, fazendo referência aos conhecimentos sobre a exposição solar e a vitamina D. Curry usa forte luz direta para distinguir os doentes dosãos. O mural está em DeLuca Biochemistry Building, no Departamento de Bioquímica da Universidade de Wisconsin-Madison.

A molécula ainda era considerada uma “vitamina” até meados da década de 1960, quando o grupo de Norman confirmou a hipótese de que a substância agiria de forma análoga à de um hormônio esteroide, no sentido de que possuía a habilidade de interagir com informações genéticas e de elicitar uma resposta fisiológica, em última instância.<sup>(8)</sup> Em 1968-69, Norman e Bouillon identificaram a proteína ligadora de vitamina D (DBP, do inglês, *D binding protein*) e seu receptor (VDR, do inglês, *vitamin D receptor*) e, posteriormente, em 1971, os grupos de Norman, Kodicek e Holick identificaram, de forma independente, o metabólito da vitamina D<sub>3</sub>: 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>.<sup>(1)</sup> Assim, sabemos que a vitamina D propriamente dita é inerte e que sua atividade biológica existe apenas em função de seu metabolismo sequencial no fígado para 25-hidroxitamina D (25(OH)D), e no rim para o hormônio esteroide 1 $\alpha$ ,25-hidroxitamina D (1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D).<sup>(9)</sup>

## 2 OBJETIVO

---



Avaliar as alterações da arquitetura da matriz extracelular da fáscia endopélvica *ex vivo*, em ratas Wistar fêmeas adultas, após administração oral de hiperdose de vitamina D.

Os objetivos específicos incluem estudos sobre:

1. Disposição das fibras de colágenos;
  2. Quantificação sinal de fibras de colágeno;
  3. Presença de outros componentes da MEC:
    - a. Componentes do citoesqueleto como alfa actina e vimentina;
    - b. Componentes da superfície celular, como heparam sulfato e glicoconjugados da superfície, este, com WGA;
    - c. Componentes da MEC como fibronectina, ácido hialurônico e elastina;
    - d. Presença de fibroblastos.
-

### **3 REVISÃO DA LITERATURA**

---

A  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  é um secosteróide que inicia respostas biológicas, ligando-se ao VDR, que possui dois sítios de ligação sobrepostos: o sítio genômico, que promove a transcrição gênica, e o sítio alternativo, que promove as respostas rápidas. O sítio genômico interage com o receptor retinóide e se liga a elementos responsivos à vitamina D na região de genes, controlados pela  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ ; o VDR modula a transcrição de genes que codificam proteínas que promulgam as funções gênicas tradicionais da vitamina D, incluindo a sinalização intestinal de absorção de Ca e P, com efeito no esqueleto e na homeostase do Ca. O sítio alternativo inicia respostas rápidas, mediadas pela  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$  ligada ao VDR, localizado nos microdomínios das cavéolas das membranas celulares. Essas respostas acontecem em 1-2 minutos ou 15-45 minutos, o que contrasta com as respostas genômicas, que levam, geralmente, de horas a dias e podem ser bloqueadas por inibidores de transcrição e tradução. Exemplos de respostas rápidas avaliadas em humanos são o estímulo hormonal rápido para absorção de Ca e a taxa de migração de células endoteliais em cultura de células.<sup>(10)</sup>

A aplicação clínica da vitamina D teve início no começo dos anos 1970, com pacientes portadores de doença renal crônica (osteodistrofia renal), em que ocorre a desativação da enzima  $1,25(\text{OH})\text{D}-1\alpha$ -hidroxilase, responsável por converter a  $25(\text{OH})\text{D}_3$  no hormônio esteroide  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . No tratamento, os pacientes recebiam administração oral de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , o metabólito ativo.<sup>(1)</sup>

A partir da década de 1970, as publicações sobre a vitamina D aumentaram quase exponencialmente. Nos últimos anos, quatro linhas de pesquisa trouxeram *insights* sobre o hormônio: [1] efeitos celulares e moleculares da  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ; [2] estudos experimentais em modelo animal (rato) *Knockout* para VDR (receptor de vitamina D); [3] estudos epidemiológicos observacionais em indivíduos com *status* variáveis de dosagem de vitamina D; [4] estudos intervencionistas prospectivos randomizados com a vitamina D. Novas evidências foram sendo acumuladas em relação às ações da vitamina para além da atuação clássica no sistema de homeostase do cálcio (intestino, rim, osso e paratireóide).<sup>(9)</sup> As associações entre a hipovitaminose e diversas doenças começaram a surgir, ao observarem que cinco sistemas fisiológicos são afetados pela vitamina D e sua interação com os

---

receptores específicos: [1] sistema imune (adaptativo e inato); [2] metabolismo do pâncreas, glicose e gordura; [3] cardiovascular; [4] músculo e sistema neural, além do [5] controle do ciclo celular e, portanto, o processo patológico do câncer.<sup>(1)</sup>

A hipovitaminose está associada a osteoporose, dores ósseas generalizadas, dores musculares, osteomalácia e fibromialgia<sup>(11,12)</sup>, fadiga<sup>(13)</sup> e também é preditora da performance física e do seu declínio em pessoas idosas.<sup>(14-19)</sup> O tratamento com doses maiores da vitamina, a partir de 800 UI/dia, representa uma diminuição de 72% do número de quedas.<sup>(20)</sup> A manutenção da vitamina D sérica, acima de 20-30 ng/mL, melhora a força muscular, o equilíbrio, a função da extremidade inferior e traz o aumento da densidade de massa óssea e a diminuição do risco de queda e fraturas ósseas.<sup>(21)</sup>

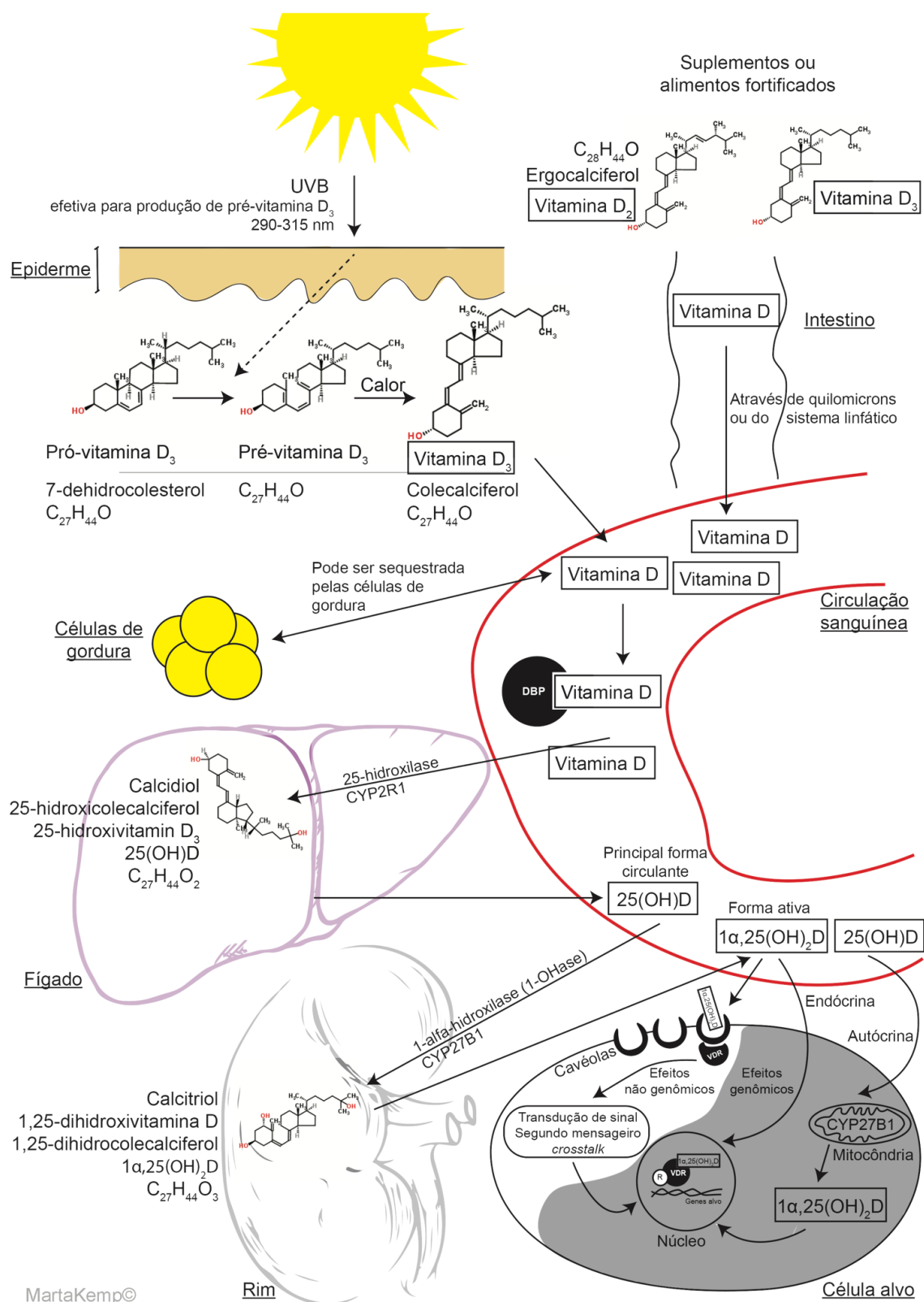
A hipovitaminose também foi associada ao aumento de infecções e, portanto, ao pior funcionamento do sistema imune<sup>(22-24)</sup>, às doenças autoimunes como a artrite reumatóide e a esclerose múltipla<sup>(25)</sup>, às doenças endócrinas com aumento do risco para desenvolvimento de diabetes tipo 1<sup>(26,27)</sup> e tipo 2<sup>(28)</sup> e à obesidade.<sup>(29)</sup> A hipovitaminose tem seu papel estabelecido nas doenças cardiovasculares, atuando tanto na regulação da pressão arterial<sup>(30,31)</sup>, quanto no processo de aterosclerose<sup>(32)</sup> e na função cardiomiocítica.<sup>(33)</sup> A hipovitaminose tem sido vinculada a alterações simples, como os distúrbios do sono<sup>(34)</sup>, assim como a alterações mais complexas, a saber: declínio cognitivo nos idosos<sup>(35)</sup>, demência, Alzheimer<sup>(36)</sup> e alterações psiquiátricas como déficit de atenção, esquizofrenia, distúrbios bipolares e outros.<sup>(37)</sup>

A vitamina D sérica foi, também, associada ao câncer. Um dos primeiros estudos, nesse campo, evidencia a capacidade de células leucêmicas, positivas para VDR e incubadas com a forma ativa da vitamina, diferenciarem-se em macrófagos, *in vitro*.<sup>(38)</sup> Outros estudos notaram que a administração da vitamina reduzia potencialmente o risco de câncer colorretal em 50%<sup>(39)</sup>, câncer de mama em 50%<sup>(40,41)</sup> e em 60% para tumores em geral.<sup>(42)</sup> Nos anos 1990, os grupos de Feldman e de Gary Schwartz demonstraram a capacidade das células prostáticas de produzir 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> para regulação do crescimento celular, evidenciando a regulação autócrina do hormônio.<sup>(43,44)</sup>

---

O sistema da vitamina D é formado por vias complexas que incluem precursores, metabólitos ativos, enzimas e receptores. O papel tradicional da vitamina D consiste na regulação do metabolismo ósseo e na homeostase cálcio-fósforo, mas estudos recentes reconheceram diversos efeitos não-calcêmicos dos metabólitos da vitamina D *in vivo* e *in vitro*. A vitamina D atua por meio de dois mecanismos farmacologicamente distintos: um mecanismo é mediado por receptor nuclear e o outro, iniciado na membrana plasmática (Figura 3).

---



**Figura 3 – Esquema representando a síntese e o metabolismo da vitamina D.** Adaptado de Holick (2016) e Norman (2011).

A radiação ultravioleta oriunda do sol (comprimento de onda de 290 a 315 nm) penetra a pele e converte o 7-deidrocolesterol em pré-vitamina D<sub>3</sub>, que é rapidamente convertida em vitamina D<sub>3</sub>. A exposição excessiva ao sol não pode causar toxicidade, pois qualquer excesso de vitamina ou pré-vitamina D<sub>3</sub> é rapidamente destruído pela própria luz solar. Alguns alimentos contêm ou são fortificados com vitamina D; a vitamina D<sub>2</sub> é manufaturada através da irradiação do ergosterol dos fungos e a D<sub>3</sub> através da irradiação do 7-deidrocolesterol da lanolina.

A vitamina D obtida na conversão da pele ou na dieta é metabolizada no fígado em 25-hidroxivitamina D (o que é usado para determinar o nível sérico da mesma), que é, então, convertida no rim em 1,25-hidroxivitamina, o metabólito ativo, pela enzima 25-hidroxivitamina D-1 $\alpha$ -hidroxilase (CYP27B1). A produção renal do metabólito ativo é finamente regulada pelos níveis séricos de paratormônio, cálcio e fósforo. Fator de crescimento 23 dos fibroblastos secretado pelo osso induz a internalização do co-transportador sódio-fósforo pelas células renais e do intestino delgado e suprime, também, a síntese de 1,25-dihidroxivitamina D. A eficiência da absorção renal e intestinal de cálcio e fósforo é aumentada pela presença de 1,25-dihidroxivitamina D, que também induz a expressão da enzima 25-hidroxivitamina D-24-hidroxilase (CYP24), que cataboliza tanto a 25-hidroxivitamina D, quanto a 1,25-hidroxivitamina D em formas biologicamente inativas, solúveis em água (ácido calcitróico).

No canto direito e abaixo da figura 3, vemos a representação da ação da vitamina em nível celular: a ativação genômica e não genômica (resposta rápida) da 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D na sinalização celular. A 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D interage com o VDR localizado no núcleo celular para gerar respostas genômicas via regulação da transcrição genética ou interage com o VDR localizado nas cavéolas da membrana plasmática, gerando respostas não genômicas. Na via genômica, a 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D leva ao *up* ou *down-regulation* dos genes sujeitos ao controle hormonal. A ligação do 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D ao VDR e associado às cavéolas pode resultar na ativação de um ou mais sistemas de segundos mensageiros, incluindo os receptores acoplados à proteína G, fosfatidilinositol-3-quinase, fosfolipase C ou proteína quinase C (CPK), havendo inúmeros resultados possíveis, abrangendo a abertura dos canais de cloreto voltagem dependente, ou canais de Cálcio, ou a geração de segundos mensageiros.

---

A  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  interage com o VDR, localizado no núcleo celular, gerando efeitos genômicos ou é internalizada nas cavéolas da membrana plasmática, dando origem aos efeitos não-genômicos (efeitos de resposta rápida).<sup>(45)</sup> O VDR é um receptor intracelular nuclear ativo em mais de 30 tecidos diferentes no homem<sup>(45)</sup> e sua ativação pode transcrever ou reprimir 913 genes, com a possibilidade de afetar a expressão de pelo menos outros 27.091.<sup>(46)</sup> O VDR está distribuído nos tecidos cardiovascular (cardiomiócitos, músculo liso), endócrino (células C da tireóide, glândulas paratireóides, ilhotas de Langerhans), epiderme (folículos pilosos, queratinócitos), gastrointestinal (estômago, esôfago, intestino, fígado), imune (timo, linfócitos T e B, medula óssea), renal (porção ascendente da alça de Henle, células justaglomerulares), respiratório (epitélio alveolar), osteomuscular (osteoblastos, condrócitos, músculo estriado), reprodutor (testículo, ovário, útero), sistema nervoso central (neurônios).<sup>(45)</sup>

Apesar de tantos estudos, a interpretação nutricional das ações do colecalciferol se mantém predominante. Hipovitaminose ou deficiência da vitamina é um termo que deve ser utilizado com bastante cautela: a explicação simplista que assume que a administração via oral promove aumento da ação do colecalciferol, não leva em conta os seus diversos mecanismos de ação com *feedbacks* positivos e negativos e outras interações moleculares e, portanto, a sua interpretação como hormônio esteróide. A interpretação das dosagens de  $25(\text{OH})\text{D}$  sérica sem outros parâmetros não é capaz de entender que a regulação negativa (*down-regulation*) não representa uma deficiência, mas uma tentativa do corpo de restaurar o equilíbrio da concentração dos metabólitos. Apenas o calcitriol ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ) é capaz de ativar a transcrição genética por meio do VDR, enquanto a vitamina D ( $25(\text{OH})\text{D}$ ) inibe este mecanismo.<sup>(47)</sup> Não apenas isso, a avaliação laboratorial é repleta de desafios, sendo a maior acurácia atingida com espectrofotometria de massa, método de alto custo e demorado, pouco utilizado nas pesquisas.<sup>(48)</sup> Apesar dessa instabilidade conceitual, as recomendações relacionadas à vitamina D sérica estão determinadas.

De acordo com o National Institute of Health (NIH)<sup>(49)</sup>, os padrões normais de vitamina D sanguínea e a recomendação de suplementação estão dispostos nas tabelas 1 e 2. As sociedades brasileiras de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial

---



e Endocrinologia e Metabologia posicionaram-se, pela última vez no início de 2018, com os valores de referência (Tabela 3). Os valores de corte para a definição de deficiência são controversos: alguns serviços consideram 20 ng/mL, enquanto outros consideram 30 ng/mL; o novo posicionamento das sociedades supracitadas utiliza 20 ng/mL como corte para a população saudável.<sup>(50)</sup>

**Tabela 1** – Níveis séricos de concentração de 25(OH)D e *status* de saúde

nmol**	ng/mL*	Status de saúde
<30	<12	Associado à deficiência de vitamina D, leva a raquitismo na infância e osteomalácia nos adultos
30 a <50	12 <20	Geralmente considerada inadequada para a saúde óssea e saúde geral em indivíduos saudáveis
≥50	≥20	Geralmente considerada adequada para a saúde óssea e geral em indivíduos saudáveis
>125	>50	Evidências emergentes relacionam potenciais efeitos adversos em níveis tão altos, particularmente >150nmol/L (>60ng/mL)

\* Concentrações séricas de 25(OH)D foram reportadas em nanomoles por litro (nmol/L) e em nanograma por mililitro (ng/mL)

\*\* 1 nmol/L = 0,4 ng/mL

Tabela adaptada das recomendações dietéticas diárias do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH – National Institute of Health). <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminD-HealthProfessional/>

As recomendações de ingestão de vitamina D são, especialmente, voltadas para mulheres na pós-menopausa e idosos acima de 75 anos, que vivem em latitudes altas, durante o inverno.<sup>(9)</sup> Apesar de o Brasil situar-se em região tropical, com exposição solar suficiente ao longo de todo o ano, estudos mostram que nossa população apresenta grande incidência de hipovitaminose e está, por consequência, sujeita às comorbidades associadas a essa condição.<sup>(51)</sup> Para os estudos realizados no sudeste, sul e nordeste do país, com grupos populacionais distintos, o denominador comum é a hipovitaminose.<sup>(52-57)</sup>

A recomendação dietética pode ser expressa em unidades internacionais (UI) ou em microgramas (mcg), sendo que a atividade biológica de 40UI equivale a 1mcg, segundo o NIH (*National Institute of Health*) atualizado em 2018. A dosagem de 25-hidroxivitamina D (25(OH)D) é mundialmente aceita como o melhor indicador do *status* da vitamina, porém a suplementação oral com doses baixas de

25(OH)D, de 10 ou de 20 mcg de colecalciferol/dose não traz alteração significativa para as concentrações de 25(OH)D no sangue.<sup>(58,59)</sup> Assim, foi sugerido que a vitamina D se comporta como a vitamina E e os carotenóides, para os quais o tecido adiposo e outros órgãos funcionam como um sistema *buffer* que, em algum grau, previne a síntese descontrolada de 25(OH)D no fígado<sup>(59)</sup>, limitando o potencial tóxico da vitamina D.<sup>(60)</sup> Assim, a liberação lenta da vitamina a partir do tecido adiposo poderia ser um fator importante para a manutenção longa do *status* da vitamina D sérica.<sup>(61)</sup> O corpo humano tem a capacidade de armazenar o colecalciferol circulante notavelmente no tecido adiposo e no músculo.<sup>(60)</sup>

**Tabela 2** – Recomendações de ingesta adequada de vitamina D

Idade	Masculino	Feminino	Gestação	Amamentação
0-12 meses	400 UI (10mcg)	400 UI (10mcg)		
1-13 anos	600 UI (15mcg)	600 UI (15mcg)		
14-18 anos	600 UI (15mcg)	600 UI (15mcg)	600 UI (15mcg)	600 UI (15mcg)
19-50 anos	600 UI (15mcg)	600 UI (15mcg)	600 UI (15mcg)	600 UI (15mcg)
51-70 anos	600 UI (15mcg)	600 UI (15mcg)		
> 70 anos	800 UI (20mcg)	800 UI (20mcg)		

Tabela adaptada das recomendações dietéticas diárias do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH – National Institute of Health). <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminD-HealthProfessional/>

**Tabela 3** – Valores de referência para vitamina D sérica, conforme as sociedades brasileiras de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial e Endocrinologia e Metabologia

Valor de referência (ng/mL)	Observação
>20	Valor desejável para população saudável até 60 anos
30 a 60	Valor recomendável para grupos de risco (idosos >60 anos, indivíduos com fraturas e quedas recorrentes, gestantes e lactentes, osteoporose, doenças osteometabólicas, medicações que possam interferir na formação e degradação da vitamina
>100	Risco de toxicidade e hipercalcemia

O colecalciferol administrado por via oral provavelmente leva a uma distribuição corpórea diferente daquela resultante da síntese na pele. Sintetizado na pele, apresenta meia-vida duas a três vezes maior e, mais de mil vezes, melhor eficiência do que ingerido.<sup>(62)</sup> O colecalciferol sintetizado é retirado da pele pela proteína ligadora de vitamina D<sup>(63)</sup>, enquanto a substância ingerida é incorporada por meio dos quilomicrons e pode ser sequestrada pelos tecidos.<sup>(64)</sup> - estes mecanismos estão representados na figura 3.

A toxicidade é ainda controversa; mesmo aumentos importantes da 25(OH)D não provocam grandes variações nos níveis séricos do seu metabólito ativo. Hipercalcemia, hiperfosfatemia e supressão da tireóide podem ocorrer <sup>(65)</sup>; um estudo com mais de 17 mil adultos saudáveis, ingerindo até 50 mil UI de vitamina D por dia, não revelou sinais de toxicidade.<sup>(66)</sup>

Nos termos da vitamina D, *high dose* significa doses intermitentes em bolus de 20 mil unidades ou dose diária de 4 mil unidades.<sup>(67)</sup> Tratamentos com megadoses de vitamina consistem na abordagem de sintomas com administração de doses massivas, conceito introduzido por Linus Pauling.<sup>(68)</sup> Em seu estudo, Brower et al. administraram alta dose oral de colecalciferol (37,5 $\mu$ g/Kg) diariamente em ratos, com diluição de 37,5 $\mu$ g em cada mL de óleo de amendoim, por 14 dias. Durante a administração da droga, o nível sérico de colecalciferol aumentou rapidamente até um platô, atingido no terceiro dia, e sofreu queda, também rápida, com meia-vida de 1,4 dias. Os níveis de 25(OH)D no soro e nos tecidos adiposos subcutâneo e perirrenal tiveram aumento linear durante o tratamento com declínio, evidenciando meia-vida de 22,5, 80,9 e 97,4 dias, respectivamente. No 20º dia, ou seja, 7 dias após interromper o tratamento, os níveis sérico e tecidual da 25(OH)D mantinham-se bastante acima (além do dobro) dos níveis mensurados antes do início da administração da vitamina.<sup>(69)</sup>

As alterações provocadas pela vitamina D nos tecidos podem acontecer por ação direta nos receptores de vitamina D ou indireta, pelo aumento dos níveis de Ca e fosfato inorgânico, o que pode acontecer de forma expressiva, conforme evidenciado por estudos com alta dose<sup>(69)</sup> e com dose tóxica<sup>(70)</sup>, administradas em ratos. Sabemos que a toxicidade está relacionada à hipercalcemia decorrente da hipervitaminose; os depósitos de cálcio nos tecidos extra-ósseos dependem da

---

dose de vitamina, período inter-doses e duração do consumo da vitamina ou do experimento. No estudo de Swierczynsky, a administração de 100.000UI de vitamina D por três dias consecutivos, em ratas fêmeas, aumentou os níveis de Ca no sangue, rins, duodeno e músculo cardíaco, porém sem efeito no conteúdo de cálcio no cérebro, músculo esquelético e fígado.<sup>(70)</sup>

### **3.1 O prolapso genital e sua relação com a Vitamina D**

O prolapso genital, enfermidade que motivou esta pesquisa, foi associado à hipovitaminose D, relativamente há pouco tempo. Em 2003, Dallosso et al. investigaram o papel da dieta e outros fatores relacionados ao estilo de vida nos sintomas de bexiga hiperativa e incontinência urinária de esforço, duas disfunções do assoalho pélvico - o termo disfunção do assoalho pélvico compreende as enfermidades incontinência urinária ou fecal, sintomas sensoriais da pelve e prolapso genital, dentre outras.<sup>(71,72)</sup> Além da associação causal com obesidade, tabagismo, bebidas carbonatadas, a dieta apresentou destaque, uma vez que evidenciou, de forma independente, associação da baixa ingestão de certos alimentos ao aumento do risco de aparecimento dos sintomas da bexiga hiperativa.<sup>(72)</sup>

Para endossar seus achados, o mesmo autor realizou uma nova pesquisa *cohort* prospectiva, com 5.816 mulheres no Reino Unido a partir de questionários de base sobre a ingestão diária de calorias, macro e micronutrientes e questionário sobre disfunções do assoalho pélvico, obtendo dados sobre a dieta e o aparecimento de sintomas de síndrome da bexiga hiperativa, no período de um ano. A ingestão de doses maiores da vitamina D foi significativamente associada à redução do risco de aparecimento dos sintomas da síndrome. Os autores fizeram, pela primeira vez, a associação entre o *status* nutricional da vitamina D e alguma disfunção do assoalho pélvico.<sup>(73)</sup>

Após esses achados iniciais, poucos pesquisadores estudaram essa associação da hipovitaminose com alguma disfunção do assoalho. Em pesquisa com

---

10 pacientes com incontinência fecal, todos apresentaram insuficiência ou deficiência nos valores de vitamina D sérica.<sup>(74)</sup> Um grupo de Nova Iorque avaliou dados nacionais de 2005 a 2006, do *National Health and Nutrition Examination Survey*, e encontrou 1881 mulheres com informações sobre a vitamina D sérica e sintomas de disfunções do assoalho pélvico e encontrou que, quanto maior o nível sérico da vitamina, menor foi o risco de qualquer disfunção do assoalho.<sup>(75)</sup> Em trabalho retrospectivo com 394 pacientes do sexo feminino, os níveis de vitamina D sérica foram maiores naquelas sem disfunções do assoalho.<sup>(76)</sup> Outro estudo *cohort* prospectivo, com 187 pacientes de ambos os sexos, relacionou o aparecimento de incontinência urinária à insuficiência da vitamina D.<sup>(77)</sup> Gau, em 2010, relatou dois casos em que houve remissão completa dos sintomas de incontinência urinária de esforço em uma paciente e de urgência, em outra paciente, após tratamento com ingestão via oral de vitamina D, até que esta atingisse valores normais.<sup>(78)</sup>

Outros dois estudos incluíram, especificamente, prolapso genital nas avaliações e encontraram associação entre os estágios do prolapso e a hipovitaminose, porém sem significância estatística; um deles contemplava 30 mulheres na pós-menopausa com prolapso versus 30 mulheres também na pós-menopausa, sem prolapso<sup>(79)</sup>; o outro, envolvia 200 mulheres de uma população geriátrica, nas quais a vitamina D sérica era inversamente proporcional ao estágio do prolapso genital.<sup>(80)</sup> Assim, temos, até o presente, apenas sete estudos que endossam a relação entre a hipovitaminose D e as disfunções do assoalho pélvico: faz-se, então, necessário desdobramento desse conhecimento inicial em novas pesquisas que justifiquem a associação das enfermidades.

O prolapso genital faz parte de um grupo de distúrbios que acontecem por uma disfunção do assoalho pélvico<sup>(81)</sup> e que tem, em geral, causas multifatoriais, sendo a lesão do tecido conjuntivo dos ligamentos suspensórios dos órgãos pélvicos a grande responsável.<sup>(82)</sup> O prolapso genital é uma doença de incidência variável, de 3 a 50%, conforme se utiliza a classificação baseada nos sintomas ou no exame físico, respectivamente.<sup>(83)</sup> Além disso, apenas 10 a 20% das mulheres, com alterações no suporte do assoalho pélvico, buscam auxílio médico por conta dos sintomas<sup>(84)</sup>, o que sugere que os valores para incidência e prevalência sejam

---

subestimados. É de grande importância para a saúde pública, pois apresenta chance de necessidade de correção cirúrgica durante a vida de 11,1% e, após uma histerectomia vaginal com correção de prolapso, a taxa de recorrência da enfermidade permanece em torno de 30%.<sup>(85,86)</sup> A doença afeta gravemente a qualidade de vida das mulheres e, muitas vezes, é negligenciada por não oferecer diretamente risco à vida.<sup>(87)</sup>

Admite-se que o VDR esteja presente nas células que compõem a musculatura esquelética e o tecido conjuntivo responsáveis pelo suporte dos órgãos pélvicos. Os órgãos pélvicos apresentam um visco oco capaz de significativa distensão e um sofisticado mecanismo de fechamento. A abertura dos órgãos está, geralmente, bem ancorada em uma estrutura tridimensional entrelaçada (fáscia endopélvica), enquanto suas porções capazes de distensão permanecem relativamente móveis para facilitar o aumento do volume/distensão.<sup>(88)</sup>

### **3.2 A Fáscia endopélvica**

A fáscia endopélvica, que conecta as vísceras, vagina, bexiga e reto à parede pélvica, é uma rede de tecido conjuntivo com bandas mais e menos densas.<sup>(89)</sup> Apesar de descrito como uma unidade, esse tecido tem regiões que recebem diferentes nomes, de acordo com a localização, orientação espacial das fibras e consistência.<sup>(90)</sup> DeLancey, em 1992, estratificou as regiões de sustentação do assoalho pélvico em níveis de I a III, conforme o tecido conjuntivo que exerce a sustentação nas regiões apical (complexo uterossacro e cardinal), média (arcos tendíneos da fáscia pélvica e da fáscia retovaginal e as fâscias pubocervical e retovaginal), e inferior (próximo ao intróito vaginal, porção inferior das fâscias retovaginal e pubocervical) que se inserem posteriormente, no centro tendíneo do períneo e lateralmente, no músculo levantador do ânus.<sup>(89)</sup> Somados a esse tecido conjuntivo, os músculos levantadores do ânus e coccígeo, que compõe o diafragma pélvico, completam o chamado assoalho pélvico.<sup>(87)</sup>

---

O funcionamento do assoalho depende das interrelações de músculo, nervo, tecido conjuntivo, vasos e ossos<sup>(82)</sup>. Quando qualquer desses tecidos está comprometido, a função do assoalho também está. A musculatura lesionada ou enfraquecida (atrófica), frequentemente presente em pacientes com alguma disfunção do assoalho, aumenta o hiato genital - espaço atravessado pela uretra, vagina e reto –, por meio do qual os descensos podem ocorrer. Dessa forma, os fatores mecânicos (gravidade e pressão intrabdominal) exercem influência no aparecimento do prolapso, agindo sobre o tecido conjuntivo ligamentar, testando sua competência e resiliência mecânica.

Sabemos que a vitamina D afeta força e função musculares<sup>(12,91-93)</sup> e também o tecido conjuntivo, podendo assim influenciar no processo de instalação das disfunções do assoalho. No entanto, essa afirmação é apenas uma inferência, já que as ações da vitamina, via VDR, são célula-específica, tecido-específica como qualquer outro hormônio.

O tecido conjuntivo, nesta pesquisa, corresponde à fascia endopélvica e suas porções mais espessas (os ligamentos). É uma estrutura funcional complexa com células especializadas, estruturas fibrosas e um meio exercendo funções integrativas, regulatórias, tróficas, biomecânicas, morfogenéticas, plásticas e protetoras em um organismo. A matriz extracelular (MEC) no tecido conjuntivo excede enormemente a massa celular que a produz, composta por fibroblastos, células especializadas que produzem e renovam a MEC mantendo, portanto, a proporção quantitativa da sua composição.<sup>(94)</sup>

As ações da vitamina D são mais conhecidas nos tecidos conjuntivos de outros órgãos e relacionadas, especialmente, a estados de doenças crônicas que cursam com a fibrose como hipertensão arterial<sup>(95-98)</sup>, hepatites<sup>(99)</sup>, nefropatias<sup>(100)</sup>, e outras. Os trabalhos que contemplam a vitamina D e o tecido conjuntivo do assoalho pélvico avaliam o epitélio vaginal e, sobre eles, teceremos comentários.

Um dos modelos animais comuns para o estudo do prolapso e da vitamina D é o rato. Em 2004, Yildirim et al. detectaram a distribuição dos receptores de vitamina D, no epitélio vaginal de ratos. Nas camadas basal e suprabasal, os receptores estavam presentes independente da fase do ciclo estral; nas demais, a presença

---

sofreu variação, conforme a fase do ciclo. Os resultados do estudo sugerem uma relação entre o receptor da vitamina, o estrogênio e a proliferação celular. Em ratas ooforectomizadas, nas quais a proliferação e o estrogênio estão extremamente reduzidos, não mostraram evidência da presença do receptor na imunohistoquímica e, quando em diestro, com os mais baixos níveis de estrogênio, as ratas apresentaram a menor marcação.<sup>(101)</sup> Tanto os receptores nucleares como os citoplasmáticos já tinham sido observados nos tecidos reprodutivos como folículos e estroma ovarianos, epitélio germinativo, tubas uterinas e útero de ratos.<sup>(102)</sup>

Em 2008, Abban et al. demonstraram, pela primeira vez, que o metabólito ativo da vitamina D induzia proliferação do epitélio vaginal e que possuía capacidade para *up-regulation* do próprio receptor, em ratas ooforectomizadas, que receberam 1,25(OH)<sub>2</sub>D intramuscular. Assim, o autor sugere o potencial da vitamina D como tratamento para atrofia genital.<sup>(103)</sup> O leitor deve se manter atento, pois o autor utiliza diversas vezes o termo “efeito da vitamina D”, podendo gerar confusão, já que a substância utilizada na pesquisa foi o seu metabólito ativo.

Em um estudo com 13 pacientes na pré-menopausa, submetidas à histerectomia por doença benigna, foi realizada biópsia do ápice da vagina, em sua espessura completa, durante o procedimento cirúrgico. Os autores encontraram a expressão do receptor de vitamina D, em todas as camadas epiteliais, com maior sinal nas camadas basal e suprabasal, onde as células sofrem os processos de proliferação e diferenciação. Durante as fases do ciclo, dessas mulheres, e conforme os diferentes níveis de vitamina D sérica, não houve diferença significativa na expressão dos receptores nas camadas epiteliais; ainda assim, houve tendência de aumento da expressão do receptor na fase proliferativa quando comparada à fase secretória.<sup>(104)</sup>

Com o efeito proliferativo da vitamina D sobre o epitélio vaginal, os trabalhos se voltaram para o aspecto da atrofia do órgão. Em 2015, Rad e sua equipe avaliaram o efeito da vitamina D, em supositórios vaginais, sobre o índice de maturação epitelial, pH e secura vaginais na pós-menopausa. O ensaio clínico foi duplo-cego, com 44 mulheres, na pós-menopausa, que receberam vitamina D ou placebo via vaginal; no grupo tratado houve aumento das células superficiais e

---



diminuição do pH vaginal. As dores, a secura e a palidez tecidual também sofreram redução nesse grupo. Os autores concluem que o tratamento tópico com vitamina D apresenta efeito protetor para atrofia vaginal, na pós-menopausa e coloca o método utilizado como agente terapêutico seguro no tratamento da atrofia vaginal.<sup>(105)</sup>

Em 2016, outro grupo estudou o papel da vitamina D na saúde vaginal em um ensaio clínico com 200 pacientes. Metade das mulheres apresentava queixas ginecológicas e a outra metade referia queixas gerais inespecíficas ou ausência de queixas; todas acima de 65 anos e com algum grau de insuficiência ou deficiência da vitamina. Todas as mulheres do estudo receberam dose semanal de 60000 UI de colecalciferol via oral, por 10 semanas e, novamente, a cada 3 meses. Elas foram acompanhadas por 6 meses, com avaliações do índice de saúde vaginal modificado (*Modified Vaginal Health Index* - MVHI) e testes laboratoriais. Mudanças dietéticas e suplementação de cálcio também foram aconselhadas. Os autores notaram que a deficiência de vitamina D aumentou com o tempo de pós-menopausa e que houve melhora do MVHI, com o aumento da vitamina D sérica. Os autores sugeriram que o tratamento da insuficiência e deficiência da vitamina D, em mulheres idosas, tem impacto positivo nos tecidos vaginais e melhora o MVHI, além de estimularem a realização de estudos para avaliar o papel da vitamina D como fator causal de doenças ginecológicas, que aumentam com a idade e o tempo de pós-menopausa.<sup>(106)</sup>

Em 2017, em estudo com objetivo similar ao anterior, Lee et al. avaliaram os efeitos da vitamina D em cultura de células do epitélio vaginal de 36 pacientes. O estudo caso-controle contava com 19 pacientes na pré-menopausa, 13 mulheres com atrofia vaginal da pós-menopausa (PAV) e 4 mulheres na pós-menopausa, sem atrofia. As pacientes foram submetidas a histerectomia, reparo do compartimento vaginal anterior ou posterior ou cirurgia de LeFort; não fica claro durante a descrição do trabalho, se todas as pacientes do grupo de histerectomia possuíam algum grau de prolapso ou a região exata da biópsia vaginal. Aquelas com atrofia receberam tratamento com estrogênio tópico. O autor conclui que a vitamina estimula a proliferação epitelial e tem efeitos positivos na junção célula-

---

célula.<sup>(107)</sup> É relevante apontar que o autor utiliza o metabólito ativo nas culturas celulares, porém, na maior parte do texto, utiliza o termo “vitamina D”; assim, o leitor pode assumir, caso não se atente ao texto completo, que os efeitos são causados pela 25(OH)D e não pelo seu metabólito ativo 1,25(OH)<sub>2</sub>D.

Infelizmente, há apenas um estudo que avalia os componentes da matriz extracelular em pacientes com prolapso, comparando com níveis séricos de vitamina D; ainda assim, não há avaliação histológica nesse trabalho. Já citado anteriormente, neste estudo, os autores mostraram a ação benéfica da vitamina D nos tecidos vaginais, com melhora do MVHI, e não descartam a possibilidade de a vitamina D poder exercer papel causal no aparecimento do prolapso. Porém, as variações da vitamina são estatisticamente significativas apenas conforme IMC, idade e tempo de pós-menopausa e não quando relacionadas ao prolapso.<sup>(79)</sup>

### **3.3 Matriz extracelular**

A estrutura do tecido conjuntivo é determinada por combinação de diferenças quantitativas e qualitativas na composição estrutural das células (próprias do tecido conjuntivo e associadas) e dos componentes não celulares, tais como: composição e estrutura da rede fibrosa, composição de proteoglicanos, propriedades físicas e químicas da matriz extracelular e o espaço entre as células. Assim, a orientação das estruturas fibrosas e o volume entre as fibras e entre as células formam a base para a determinação dos tecidos conjuntivos frouxo, denso regular (orientado) e denso irregular (não orientado) como a derme, os tendões, e a fáscia endopélvica, respectivamente.<sup>(94)</sup>

Ao longo da vida, o corpo humano está constantemente exposto a diversas influências (variadas condições biomecânicas e bioquímicas) que o danificam, resultando em prejuízo estrutural para além dos limites fisiológicos, formando tecido conjuntivo reparativo nas áreas danificadas.<sup>(94)</sup> Assim ocorre no tecido de órgãos prolapsados, constantemente sujeitos a estresse biomecânico.

---

Uma peculiaridade do tecido conjuntivo é o intenso desenvolvimento da matriz extracelular. A principal função das células especializadas, desse tecido, é a biossíntese das macromoléculas que o compõe. O fenótipo bioquímico dos tecidos conjuntivos é dado pela expressão de certo conjunto de genes que codificam os componentes da matriz e que são típicos para cada tecido.<sup>(94)</sup> A vitamina D, como qualquer hormônio, apresenta ações tecido-específicas e, como ainda não foi testada no tecido conjuntivo da pelve, não podemos afirmar que tenha atividade direta, indireta ou de que forma essa atividade influenciaria a expressão dos genes que compõe a matriz extracelular, dessa região.

Dentre esses componentes considerados marcadores fenotípicos, encontramos três grandes classes: macromoléculas estruturais, enzimas e proteínas sinalizadoras. Além deles, temos as proteínas do plasma sanguíneo (albumina), metabólitos que se locomovem através da matriz (glicose, aminoácidos, sais e outros) e fatores reguladores sistêmicos (hormônios, vitaminas) que são direcionados da corrente sanguínea para as células através da matriz extracelular.<sup>(94)</sup>

Os glicosaminoglicanos são heteropolissacarídeos lineares formados por unidades dissacarídicas repetitivas, constituídas por uma hexosamina unida por ligação glicosídica a um açúcar não nitrogenado, composição que resulta em diversos glicosaminoglicanos como o heparam sulfato e o ácido hialurônico.<sup>(108)</sup> Os proteoglicanos são compostos de alto peso molecular, formados por um esqueleto proteico ao qual ligam-se cadeias de GAG's e oligossacarídeos; eles estão presentes na MEC, membrana basal, superfície celular e nos grânulos secretórios intracelulares.<sup>(108)</sup> Dentre todos os glicosaminoglicanos, o ácido hialurônico é o único que não ocorre covalentemente ligado à proteína sob a forma de proteoglicano. Os PG's e os GAG's atuam como organizadores de tecidos, exercendo influência no crescimento celular e na maturação de tecidos especializados, apresentam importante papel como filtros biológicos, modulam a atividade de determinados fatores de crescimento, regulam a fibrillogênese do colágeno e afetam o crescimento e invasão tumoral.<sup>(108,109)</sup> Os componentes da matriz extracelular estão representados na figura 4.

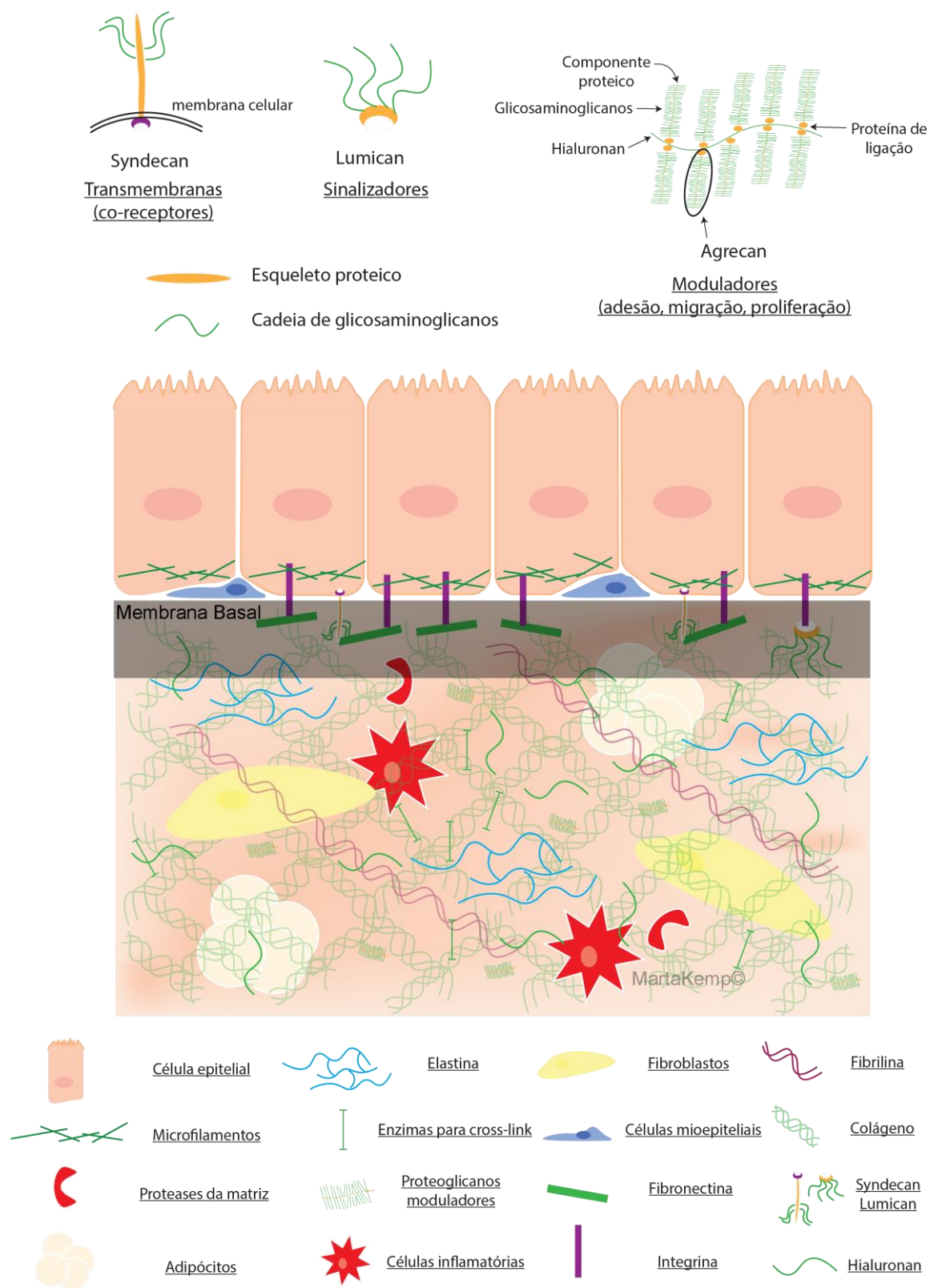
---

Vale lembrar que, na figura 4, o retângulo escuro, logo abaixo do epitélio, representa a lâmina ou membrana basal, bastante diferente do restante do tecido conjuntivo frouxo, sendo uma porção altamente especializada da MEC, um ambiente dinâmico e versátil que modula o comportamento celular, regulando desenvolvimento, função e reparo do tecido.<sup>(109)</sup> Nesta região complexa formada por proteínas secretadas e glicoconjugados, há uma rede molecular capaz de regular funções celulares como diferenciação e expressão de genes específicos, para cada tecido além de participar de eventos celulares como adesão, migração, proliferação, apoptose e angiogênese, entre outros.<sup>(110)</sup>

O fator biomecânico influencia a expressão gênica<sup>(111)</sup> e a disposição das células e das estruturas fibrosas na MEC, alterando sua qualidade. No tecido conjuntivo da pelve, a quase totalidade das pesquisas se dá em pacientes com prolapso genital. Os fibroblastos de pacientes com prolapso genital apresentam maior sensibilidade e menor tolerância ao estresse biomecânico de alongamento.<sup>(112)</sup> O alongamento mecânico exerce influência sobre a morfologia e citoesqueleto dos fibroblastos, com maior quantidade de F-actina,  $\alpha$ -tubulina e vimentina<sup>(112)</sup>, resultando em maior rigidez dos tecidos.<sup>(113-116)</sup> Essas diferenças morfológicas e funcionais de tecidos sujeitos a estresse biomecânico poderiam ao menos em parte explicar, nas correções cirúrgicas do prolapso genital com tecido autólogo, um tecido doente, as altas taxas de recorrência.<sup>(85,86)</sup>

A ação hormonal que pode promover diferenças nos tecidos de mulheres na menacme, conforme a fase do ciclo e na menopausa, é avaliada em alguns estudos, mas é ainda controversa em relação a testes de estresse biomecânico sobre o tecido conjuntivo, pela utilização de amostras diferentes (biópsias teciduais ou cultura de células) tipo de estresse e ao tipo de força mecânica aplicada (cíclica ou estática, compressão ou alongamento, frequência e duração).<sup>(112,117)</sup>

---



**Figura 4 – Esquema representativo dos proteoglicanos (superior) e da distribuição dos componentes da matriz extracelular (inferior).**

### **3.4 Ácido Hialurônico**

O glicosaminoglicano estrutural hialuronam ou ácido hialurônico (AH) está presente na MEC dos tecidos conjuntivos em geral. O grupo de Carla e Antonio Stecco demonstrou, pela primeira vez, as variações na quantidade do AH em amostras de fáscia coletadas de diversos sítios diferentes, consistentes com a região em que as lâminas faciais deslizam uma sobre a outra (maior quantidade) ou em que são completamente aderidas ao músculo subjacente (menor quantidade).<sup>(118)</sup>

### **3.5 Heparan Sulfato**

O heparan sulfato (HS) é outro glicosaminoglicano estrutural, produzido por todas as células animais e que contém uma variedade de arranjos com açúcares sulfatados e não sulfatados. As regiões sulfatadas das cadeias permitem que a molécula interaja com um grande número de proteínas, incluindo fatores de crescimento e componentes da MEC, assim como com diversas enzimas e fatores presentes no plasma, permitindo a sua participação em processos como reconhecimento, migração, adesão, proliferação, diferenciação celulares, angiogênese, inflamação, mecanismos de defesa, estrutura da MEC, dentre outros.<sup>(119,120)</sup>

### **3.6 Fibronectina**

A fibronectina (FN), proteína fibrosa da MEC reticular, tem domínios específicos para interação com fibrina, heparan sulfato, colágeno, proteínas da membrana plasmática chamadas de integrinas, que fazem a mediação para sinalização entre o interior da célula e a MEC. As interações servem, não apenas para ancorar as células à MEC, mas também para formar caminhos que direcionam a migração celular em tecidos em desenvolvimento, e para transmitir informações

---

em ambas as direções, por meio da membrana plasmática. A FN celular tem diversas variantes com diferentes propriedades de adesividade celular, de sítios de ligação e de solubilidade, o que oferece às células mecanismos para alterar a composição da MEC. A FN se liga às integrinas, receptores heterodiméricos de membrana celular relacionados a estrutura e função, que ligam a MEC ao esqueleto intracelular. Também se liga ao HS e, em algumas células, essa ligação pode potencializar a adesão celular. Quanto à ligação com o colágeno, sua função fisiológica pode estar mais relacionada ao *clearance* do colágeno que à adesão celular ao colágeno.<sup>(121,122)</sup>

### 3.7 Wheat Germ Agglutinin (WGA)

O *Wheat Germ Agglutinin* (WGA) é uma lectina, proteína que faz ligação com carboidratos com alta especificidade e moderada a alta afinidade, que reconhece resíduos de N-acetil-glucosamina e ácido siálico presentes em glicoconjugados. A porção carboidrato dos glicoconjugados participa de uma variedade de processos de reconhecimentos célula-célula, sinalização e adesão, além de segmentação intracelular (*intracellular targeting*) de proteínas recém sintetizadas. O WGA é utilizado para visualização da parte carboidrato de membranas e da matriz extracelular.<sup>(123,124)</sup>

### 3.8 Vimentina

O citoesqueleto das células eucarióticas é constituído por F-actina, microtubulos e filamentos intermediários. Os filamentos intermediários contêm as queratinas e a vimentina, dentre outros. Além de participar da arquitetura celular, estes filamentos também são responsáveis pela interação e regulação de outros elementos celulares. Nos fibroblastos, a rede de filamentos intermediários de vimentina se estende por toda periferia do citoplasma, mas não o popula completamente e não está ligada aos sítios de adesão celular. Defeitos na estrutura

---

da polimerização ou organização dos filamentos intermediários leva a um estado de fragilidade que pode ser traduzido em perda de integridade celular e exposição à forças de cisalhamento.<sup>(120,125)</sup>

### 3.9 Alfa-actina

As actinas são “blocos de construção” essenciais do citoesqueleto que formam cabos e suportes e são constantemente remodelados por mais de 100 diferentes proteínas ligadoras de actinas. A iniciação de um novo filamento de actina e sua subsequente organização é passo chave para o desenvolvimento de estruturas especializadas como as fibras de estresse (feixe elástico e contrátil). O citoesqueleto de actina serve como malha estrutural para sinalização, uma conexão entre o ambiente extracelular e um mecanorreceptor. O esqueleto de actina mantém a compartimentalização dos componentes intracelulares e, portanto, é um determinante da polaridade celular, essencial para homeostase celular e que, quando rompido, leva à quebra das junções célula-célula e da transição epitélio / mesenquima. Sob a membrana plasmática repousa uma malha de filamentos de actina e proteínas que fazem *cross-linking*, esta malha recebe o nome de córtex. Uma aderência fraca do citoesqueleto ao córtex gera, com a contratilidade da actina-miosina, bolhas (desconexões entre o córtex e a membrana).<sup>(126)</sup>

O córtex também fornece uma estrutura para a organização dos receptores transmembrana e glicoproteínas, dentro dessa malha para efetividade na transdução de sinais e acoplamento de estresse mecânico para geração de sinais. As fibras de estresse conectam o citoesqueleto à MEC nos sítios de adesão focais, onde integrinas abrangem a membrana plasmática e se agrupam para formar macromoléculas tridimensionais maiores de proteínas de sinalização e do citoesqueleto. A alfa actina 1 se distribui ao longo das fibras de estresse de forma periódica e se liga a diversos constituintes de adesão focal; portanto, conectando o citoesqueleto de actina à membrana celular.<sup>(124,126)</sup>

---



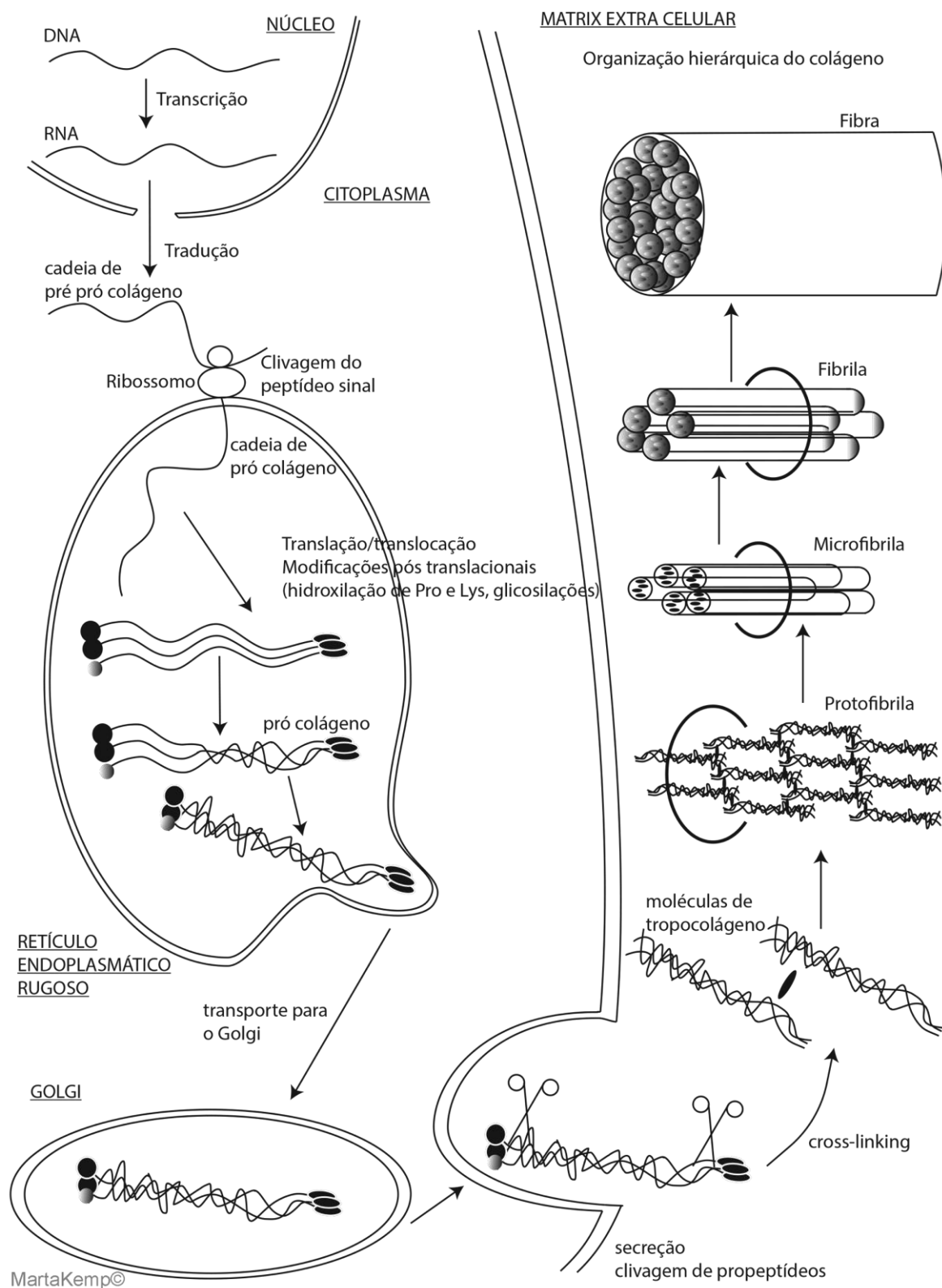
### 3.10 Elastina

A elastina, proteína fibrosa da MEC, tem propriedades elásticas e reversíveis. As fibras elásticas têm a propriedade de sofrerem grande deformação aos menores estímulos e de recuperarem completamente sua extensão e tamanho originais, mesmo após grandes deformações. É esta propriedade que coloca essas fibras elásticas nas estruturas de órgãos que sofrem grandes deformidades ao longo das suas atividades vitais (derme, membranas de vasos, tendões, ligamentos e órgãos).<sup>(127)</sup>

### 3.11 Colágeno

Das proteínas fibrosas da MEC, o colágeno é a mais abundante, responsável por mais de 30% de toda massa de proteínas nos humanos. Conhecido como uma proteína única até o final da década de 1960; hoje, mais de 20 tipos de colágeno são conhecidos, com estruturas e localização celular e tecidual distintas. O colágeno tipo I, mais frequente, codificado por pelo menos 44 genes, é uma molécula heterotrimérica composta por duas cadeias  $\alpha 1$  e uma cadeia  $\alpha 2$ , com aproximadamente 300 nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro. Sua biossíntese é um processo longo e complexo que inclui transcrição gênica, modificações pós-translacionais de cadeias pro $\alpha$ , formação de uma molécula de procolágeno em tripla hélice, secreção para a MEC, processamento enzimático para a formação de uma molécula de colágeno e arranjo em fibrila com estabilização por ligações covalentes, formando *cross-links* intra e intermoleculares<sup>(111)</sup>, responsáveis pela estabilidade da molécula. A biossíntese e a organização hierárquica do colágeno estão representadas na figura 5.

---



**Figura 5 – Biossíntese e organização hierárquica do colágeno.**

A imagem representa toda biossíntese e organização do colágeno. A expressão dos genes decodificadores de colágeno tipo 1, modificações múltiplas e sequenciais dos processos pós-translacionais, necessárias para o correto posicionamento das cadeias  $\alpha$  em tripla hélice, fibrilogênese e estabilização das fibrilas. A formação da base fibrosa do tecido conjuntivo se dá em duas etapas: intracelular e extracelular (através da agregação das moléculas já formadas). O tropocolágeno é liberado em bastões, formando agregados moleculares paralelos entre si; o aumento da concentração de colágeno adjacente à superfície da célula e o aumento da síntese de glicosaminoglicanos tornam essas moléculas, suficientemente, próximas para que a força intermolecular consiga agir e formar protofibrilas. Quatro a cinco dessas moléculas em conjunto, interagindo por forças opostas nas suas superfícies, positivas ou negativas, com uma distância axial de aproximadamente  $3/4$  do comprimento da própria molécula, formam as microfibrilas (formando estrias periódicas que são um marcador morfológico específico do colágeno). A interação entre as microfibrilas, por sua vez, se dá através dos glicosaminoglicanos nas suas superfícies, que permitem diferentes espessuras desses agregados, as fibrilas. Através dos mesmos mecanismos que as microfibrilas, as fibrilas formam agregados ainda maiores: as fibras.<sup>(127)</sup>

A formação das fibrilas e de seus agregados ainda maiores, as fibras, depende de inúmeros fatores (proteoglicanos, íons formadores de complexo, ATP, ácido ascórbico, aldeídos, enzimas glicolíticas) e condições (água do meio, concentração de tropocolágeno, pressão osmótica, temperatura, pH, força iônica e mobilidade do meio). Durante a formação/remodelamento/adaptação da rede fibrosa, o fator biomecânico externo (contração muscular, fluxo sanguíneo pulsátil, alterações do fluido osmótico) influenciam na formação estrutural (orientação das fibras e fixação das suas formas). As fibrilas estão, de alguma forma, comprimidas, com aparência espiralada, o que daria a elas certa mobilidade, mas o potencial de alongamento da estrutura fibrilar pela desespiralização é limitado.<sup>(127)</sup>

As fibras apresentam-se em três padrões: espiralado, ramificado/integrador (um dos mecanismos de suporte para integridade da estrutura da fibra) e misto (as fibras mistas são compostas por colágeno e elastina, que interagem por meio de proteoglicanos que formam “zonas de contato”). Quando o órgão distende, as fibras

---

colágenas, elásticas e fibrilas alongam. Ao retirar o estresse mecânico, as fibras elásticas contraem e as fibras colágenas retornam ao estado inicial espiralado. As fibras colágenas desespiraladas não podem ser alongadas além de certo limite sem que danos aconteçam. Quando as estruturas permanecem alongadas por longo tempo, ocorre o remodelamento do colágeno e das fibras elásticas e o aumento de fibroblastos em quantidade e atividade, na área de remodelamento.<sup>(127)</sup>

### 3.12 A Estrutura da Fáscia Endopélvica

Robert Hooke, em seu livro *Micrographia*, em 1665, afirmou que, ao observar a estrutura da cortiça, suas celas, podia entender tudo sobre as suas funções. Ao longo dos anos adotou-se uma abordagem bioquímica aos estudos das doenças e de seus tratamentos com um acúmulo incalculável de conhecimento sobre as reações e interações das vias metabólicas, mas, recentemente, a abordagem estrutural e biomecânica voltou a receber atenção. Um novo olhar sobre o tecido conjuntivo revisita esse conceito e as avaliações *in vivo* do interstício culminaram na reclassificação deste tecido em órgão.<sup>(128)</sup>

Outros estudos também reforçam o papel das alterações estruturais na mecanotransdução, relevante para forças mecânicas fisiológicas e terapêuticas aplicadas ao tecido conjuntivo.<sup>(129,130)</sup> A própria fáscia dos grandes grupos musculares, antes descritas nos livros de anatomia como envoltórios dos músculos de estrutura semelhante às redes de pescaria, tem, hoje, suas funções elucidadas, pois sabe-se que apresenta três camadas que deslizam uma sobre a outra e que são compostas por fibras de colágeno orientadas diferentemente em cada camada, conforme o movimento do músculo subjacente e dos sinergistas.<sup>(131-133)</sup> A disposição das fibras da matriz extracelular determina a comunicação entre as células no microambiente que a circunda, assumindo importância além da função mecânica, como a assinatura do prognóstico do câncer de mama pela orientação das fibras colágenas em relação ao tumor.<sup>(134)</sup>

---

Buscando os trabalhos que avaliam a histologia, a organização molecular da fáscia endopélvica e o colágeno, encontramos dois estudos que abordam o status menopausal dos sujeitos da pesquisa e nove que abordam o prolapso genital (Tabela 4). A tabela evidencia algumas diferenças metodológicas sobre região e tecidos analisados; as técnicas laboratoriais utilizadas estão simplificadas em análises quantitativas, como digestão enzimática, e qualitativa, como a quantificação de sinal de imagens em microscopia em relação ao colágeno.

---

**Tabela 4** – Estudos que analisam o colágeno na MEC do tecido conjuntivo do assoalho pélvico

Autor, ano	População	Região/tecido analisado	Estrutura tecidual	Método	Colágeno	Análise
Moalli, 2004	10 préM + 12 pósM em RH	ATFP	Compacta, longas bandas paralelas de fibras colágenas sem diferença consistente na aparência ou organização entre grupos	Microscopia eletrônica	↓ Colágeno I na pósM	Qualitativa
Sridharan, 2011	2 préM + 3 pósM	Parede vaginal (muscular e mucosa)	Colágeno com interações mais firmes, fibras enrugadas com orientação aleatória e sem alinhamento na préM	<i>Atomic force microscopy</i>	↓ Densidade de colágeno	Qualitativa
Kerkhof, 2014	13 POP x 13 sem POP, todas préM	Pré cervical parede anterior POP x ápice vaginal controle	POP mostra SMCs arranjadas mais próximas, melhor organizadas e orientadas longitudinalmente e em maior número	<i>Digital Mirax slide scanner system</i>	≈	Qualitativa
Kokçu, 2002	24 POP x 21 controles; todas préM	Fáscia vaginal (pré cervical, LUS, LC, LR)	Não descreve organização tecidual		↓ Colágeno total	Qualitativa
Makinen, 1986	10 POP x 10 controle	Pré cervical parede vaginal anterior	↑ fibras colágenas ao redor dos fibroblastos, que estão ↓	Microscopia convencional	↑ fibras	Qualitativa
Moalli, 2005	31 préM (16 POP x 15 controle) + 46 pósM POP (23 em RH x 23 não RH)	Fórnice Lateral do ápice vaginal	Sem diferença consistente na orientação das fibras colágenas no POP x controle e préM x pósM. Bandas de colágeno no subepitélio vaginal não paralelas e em padrão espiralado	<i>Scanning electron microscopy</i>	↑ POP x controle e pósM sem RH	Quantitativa
Söderberg, 2004	22 POP x 13 controle	Ligamentos parauretrais	Menor densidade do subepitélio no POP, semelhança nas outras camadas	Microscopia convencional	↓ no POP (em mulheres abaixo de 53 anos)	Quantitativa
Borehan, 2002	28 POP x 12 controle	Ápice parede vaginal anterior	Colágeno disperso e pobremente organizado além de vênulas dilatadas	Microscopia convencional	-	-
Badiou, 2008	11 POP x 8 controle	Parede vaginal anterior média POP e ápice vaginal	POP com numerosas vênulas dilatadas na LP; na muscular bandas de células musculares menores e em menor quantidade e pobremente organizadas; fibras colágenas dispersas frouxamente e pobremente organizadas	Microscopia convencional	-	-
Kim, 2015	4 préM x 5 pósM x 5 pósM com POP	Tecido conjuntivo da parede vaginal	No POP, rede de fibras soltas e frágeis, as fibras parecem "estressadas" e soltas	<i>Atomic force microscopy</i>	↓ Colágeno total com ↑ da taxa colágeno I/III em duas vezes	Qualitativa
Kotova, 2015	12 POP x 18 controle	Pele região perianal e LU	No POP região perianal: fibras formando rede mais solta, menos densa; no LU: ↑ das lacunas entre as fibras e desintegração completa das bandas de colágeno	<i>Atomic force microscopy</i>	-	-

POP=Prolapso de órgão pélvico, RH=reposição hormonal, préM=pré menopausa, pósM=pós menopausa, ATFP=arco tendíneo da fáscia pélvica, LUS=ligamento uterossacro, LC=ligamento cardinal, LR=ligamento redondo, SMCs, do inglês, *smooth muscle cells*=células de músculo liso; (↑)=aumento, (↓)=redução, (≈)=semelhante.

A tabela evidencia a dificuldade de se comparar os resultados dos estudos, pois há grande variedade em relação à região do tecido estudada, nem todos detalham o *status* menopausal da amostra, raros citam a fase do ciclo menstrual e a maioria, quando avalia a influência hormonal, divide os grupos em pré e pós menopausa, sem diferenciar as fases do ciclo na pré menopausa. Alguns estudos

comparam regiões fasciais diferentes entre os grupos estudados, como fez Badiou em 2008, avaliando a região média da parede vaginal anterior no grupo com POP e a região pré-cervical no grupo controle. Outros não especificam a localização da biópsia, como Kim em 2015, quando descreve apenas “tecido conjuntivo da parede vaginal”.

A avaliação do colágeno na fáscia endopélvica foi descrita pelo grupo de Moalli em tecidos saudáveis de mulheres na pré e pós-menopausa como compacta e composta por longas bandas paralelas<sup>(135)</sup>; com fibras organizadas em “tecido de cestaria” no subepitélio do ápice vaginal de mulheres na pré e pós-menopausa com e sem prolapso<sup>(136)</sup>, semelhante à descrição por Sridharan em fibras enrugadas com orientação aleatória e sem alinhamento na pré-menopausa no subepitélio da parede vaginal.<sup>(137)</sup> Nos estudos que fizeram comparação com o prolapso, independente do *status* menopausal, a organização do colágeno foi descrita da seguinte forma nos pacientes saudáveis: fibras de colágeno longas, espessas e compactas no ligamento cardinal<sup>(138)</sup>; numerosos fibroblastos circundados por moderada quantidade de fibras finas de colágeno igualmente distribuídas na fáscia da região pré-cervical.<sup>(139)</sup>

O estudo que evidenciou diferença entre menacme e menopausa fez a seguinte descrição: na pré-menopausa sem prolapso as fibrilas de colágeno são acomodadas densamente e alinhadas uniformemente, formando bandas de fibras colágenas que, por sua vez, formam uma rede.<sup>(140)</sup> Na camada muscular, as fibras de colágeno têm disposição densa e compacta, circundando discretas bandas de células musculares da porção média da parede vaginal anterior.<sup>(141)</sup> e no ápice vaginal o colágeno está organizado de maneira densa e compacta circundando as células musculares.<sup>(142)</sup>

---

### **3.13 Modelo animal para estudo dos tecidos de sustentação dos órgãos pélvicos**

A escolha do modelo animal, mais especificamente os ratos, já foi suficientemente discutida na literatura. Atualmente, os roedores são o modelo animal mais utilizado para estudo do prolapso genital, da incontinência urinária e de novos tratamentos para essas doenças.<sup>(143,144)</sup> Apesar de pequenos, ratos e camundongos são fáceis de manipular, além de não exigirem alto custo para aquisição e manutenção.<sup>(144)</sup> O ciclo estral é curto e previsível<sup>(144)</sup>, assim como o tempo de vida, conforme o ambiente.<sup>(145,146)</sup> Além disso, a escolha desse modelo animal traz as vantagens do controle sobre variações genéticas (o modelo é realizado com ratos produtos de 20 gerações consecutivas de acasalamento entre irmãos, o que torna os animais quase idênticos), além do controle sobre os fatores ambientais, removendo grande parte dos fatores de confusão que encontramos nos estudos com humanos: genéticos, nutricionais, biomecânicos, e outros.

Os roedores têm ligamentos uterossacros que também ligam o terço superior da vagina à porção inferior da coluna vertebral, os ligamentos paravaginais inserem-se em densificações de tecido conjuntivo que se estendem da púbis à parede pélvica lateral e que exerce função semelhante à do arco tendíneo da fáscia pélvica nos humanos.<sup>(143)</sup> Ao contrário dos humanos, o músculo levantador do ânus nos ratos aparentemente não tem papel no suporte vagina, mas no suporte da cauda; apesar disso, o modelo animal é considerado adequado para a análise da vagina e dos seus tecidos de suporte correlacionado aos humanos.<sup>(147)</sup>

Iwanaga et al.<sup>(148)</sup> realizaram a comparação anatômica e histológica dos ligamentos pélvicos de camundongos, ratos e humanos, mostrando serem, ambos os roedores, modelos adequados para comparação com humanos, em relação ao prolapso apical e para a pesquisa do tecido conjuntivo presente no sistema de sustentação dos órgãos pélvicos. Confirmaram a presença dos ligamentos cardinais e suas relações anatômicas. Histologicamente, a arquitetura dos ligamentos uterossacros, cardinais e redondos é semelhante entre as espécies. Moalli et al. também chegaram à conclusão de que a vagina dos ratos tem tecido de sustentação análogo ao humano.<sup>(147)</sup>

---

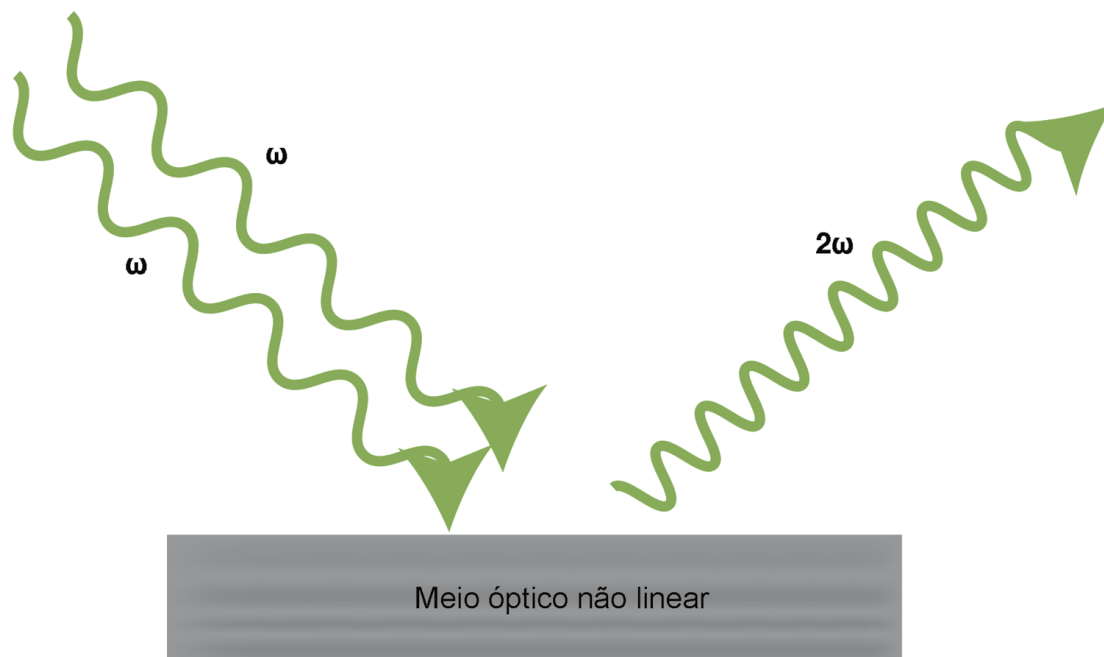


### **3.14 Técnica para análise da arquitetura dos tecidos: geração de segunda harmônica**

A maioria dos estudos utiliza para a avaliação dos componentes da matriz extracelular colorações ou marcações com anticorpos. O preparo dos tecidos para essas técnicas inclui banho em temperaturas altas, lavagens sucessivas da lâmina que contém a amostra de tecido e contato com diversos produtos químicos, que podem provocar o aparecimento de artefatos nas imagens. A melhor técnica para avaliação estrutural de qualquer tecido é aquela que oferece menor interferência na apresentação do mesmo, como a microscopia por geração de segunda harmônica (SHG, do inglês, *Second Harmonic Generation*), um tipo particular de microscopia *multifoton*. O SHG é uma opção atrativa para visualização da estrutura macromolecular e arranjo tecidual do colágeno pela natureza livre de colorações ou marcações e pela alta sensibilidade e especificidade da técnica.

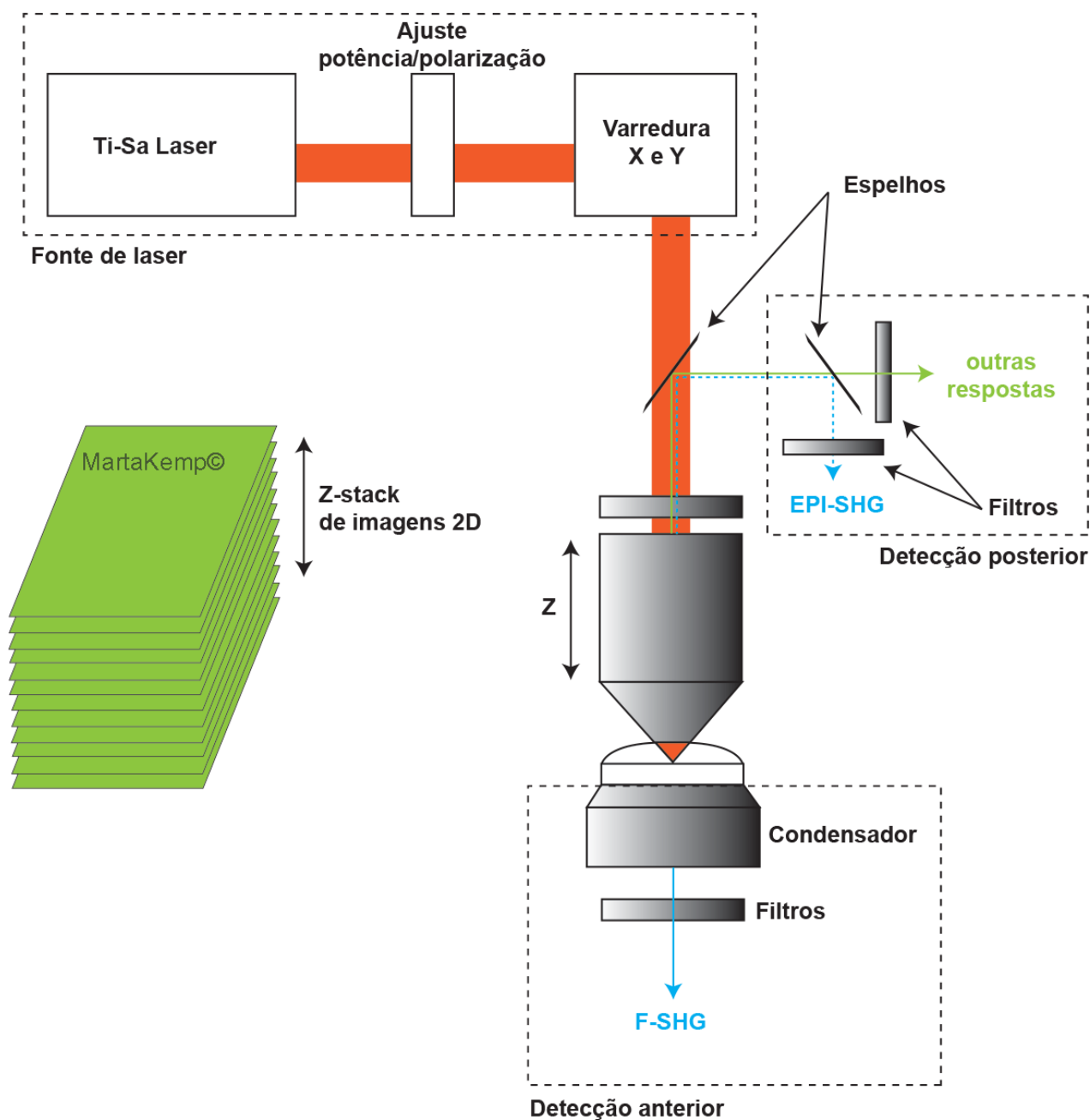
A técnica utiliza a emissão de um feixe de laser de intensidade suficientemente alta capaz de promover a interação de dois fótons com um meio que apresente características ópticas não lineares. O colágeno fibrilar (I e III), diferente dos outros tipos, dispõe dessa característica não centro-simétrica em que há um alinhamento das ligações peptídicas e, portanto, uma eficiente amplificação dos sinais gerados, processo que acontece em todos os níveis estruturais hierárquicos da molécula (hélice, fibrilas, fibras). O colágeno que recebe os dois fótons é então capaz de responder, gerando um novo fóton com exatamente metade do comprimento de onda ou duas vezes a frequência dos fótons incidentes.<sup>(149)</sup> (Figura 6).

---



**Figura 6 – Geração da segunda harmônica.** Dois fótons interagindo com um meio óptico não linear capaz de gerar um fóton com o dobro da energia ( $2\omega$ ) e, portanto, com o dobro da frequência ou metade do comprimento de onda dos fótons iniciais (geração de segunda harmônica).

A fonte de laser emite um feixe que é amplificado e, em seguida, direcionado à objetiva; ao interagir com a amostra de tecido, este gera novos fótons que podem correr no mesmo sentido (sinal que será captado pelo detector anterior F-SHG) ou em sentido oposto (sinal que será captado pelo detector posterior EPI-SHG) (Figura 7). O uso de ambas as captações é reportado em alguns estudos como técnica para determinar a organização das fibras colágenos em pacientes com DPOC e controles<sup>(149)</sup> e, em outros trabalhos, como capaz de diferenciar os tipos de fibras entre I e III.<sup>(150)</sup>



**Figura 7 – Esquema representando a configuração da microscopia com SHG.** A imagem representa a emissão de laser sobre o tecido a ser analisado e a detecção dos sinais, além da formação de diversos planos de imagens que, somados, dão origem a uma imagem tridimensional. F-SHG = Detector anterior, EPI-SHG = detector posterior.

Supondo que exista associação entre baixos níveis séricos de vitamina D e prolapso genital, doença em última instância mecânica, parece óbvio avaliar a arquitetura da fáscia endopélvica para lograr encontrar alterações estruturais em tecidos saudáveis sob diferentes concentrações de vitamina D e, supostamente, de seus metabólitos. Essas alterações na arquitetura da MEC poderiam sugerir diferentes propriedades biomecânicas do aparato de suporte pélvico, explicando uma futura perda da capacidade da fáscia endopélvica de exercer sua função de sustentação em pacientes com hipovitaminose. Não há na literatura estudos sobre a fáscia endopélvica com este formato de avaliação da estrutura da MEC, incluindo a influência da administração oral da vitamina D.

---

## 4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

---

#### 4.1 Sujeitos da Pesquisa

Foram utilizadas 24 ratas fêmeas Wistar em idade adulta. Os animais foram fornecidos pelo Laboratório de Experimentação Animal (LEA) do Instituto de Farmacologia e Biologia Molecular (INFAR), registro CEUA/UNIFESP, nº 14-23 de agosto de 2016; CEUA N 2503060715.

Todos os animais chegaram ao biotério com oito semanas de vida e foram mantidos no biotério do laboratório de experimentação animal do Instituto de Farmacologia e Biologia Molecular da EPM-UNIFESP. Permaneceram em gaiolas na mesma sala, durante todo o período da pesquisa, e foram manuseados pelo mesmo e único técnico do laboratório, em todas as etapas.

As ratas foram mantidas, conforme as especificações: temperatura do ambiente entre 20 a 24°C; ciclo circadiano de 12 horas de luz (artificial) e 12 horas de obscuridade; densidade populacional de quatro ratas por gaiola (em gaiolas que suportam até seis animais); alimentação com ração oferecida *ad libitum* em comedouro (o que não fosse consumido era trocado com frequência); fonte de água com água autoclavada, oferecida *ad libitum* em bebedouro (o que não fosse consumido era trocado com frequência); exaustão de ar em sistema com entrada de ar estéril.

#### 4.2 Vitamina D e veículo de administração

A vitamina D administrada foi adquirida em farmácia comum com as seguintes especificações:

**AdderaD3:** Colecalciferol - vitamina D3 - 3300Ui/mL, solução oral, uso adulto e pediátrico. Composição: cada 1mL (25 gotas) contém 3300 UI de Colecalciferol (vitamina D3), 3 gotas = 400 UI de colecalciferol e 6 gotas = 800 UI de colecalciferol, 200 e 400% respectivamente da IDR (ingestão diária recomendada). A vitamina foi conservada conforme indicado no rótulo, em temperatura entre 15-30°C, protegida

---

da luz. 815L0431; fabricado em 11/2015, válido até 11/2017. Reg. MS - 1.7817.0028.001-0 - Farm. Resp.: Dr. Carlos Takashi Maki - CRF-SP nº 5606. Registrado por: Cosmed Indústria de Cosméticos e Medicamentos S/A - Av. Fernando Cerqueira César Coimbra, 1000 - Barueri – SP. CNPJ nº 61.082.426/0002-07 - Indústria Brasileira. Fabricado por: Brainfarma Indústria Química e Farmacêutica S/A - Rua VPR 01, quadra 02 A, Módulo 4, DAIA Anápolis-GO.

O óleo de amendoim, utilizado como veículo de administração da vitamina D, foi adquirido em supermercado comum com as seguintes especificações: **Óleo de Amendoim:** Marca Triângulo. Dados nutricionais e do fornecedor estão mostrados na tabela 5.

**Tabela 5** – Valores nutricionais presentes na embalagem do óleo de amendoim

Quantidade por porção (13 mL)		%VD(*)
Valor energético	108 kcal = 454kJ	5
Carboidratos	0 g	0
Proteínas	0 g	0
Gorduras totais	12 g	22
Gorduras saturadas	2,1 g	9
Gorduras monoinsaturadas	7 g	**
Gorduras polinsaturadas	2,9 g	**
Gorduras trans	0 g	**
Colesterol	0 mg	**
Fibra alimentar	0 g	0
Sódio	0 mg	0
Vitamina E	1,4 mg	14

Marca: Triângulo

Código de barras: 7 897279 501528

Informação nutricional: (por porção de 13 mL)

Produzido e envasado por: Triângulo Alimentos Ltda. CNPJ 44.022.424/0002-03 – Av. José de Barros Ribeiro, 168. CEP 14900-000 – Itápolis/SP.

Ingredientes: óleo de amendoim refinado, antioxidante BHT (INS 321) e agente sequestrante ácido cítrico (INS 330). Não contém gluten.

Produto dispensado da obrigatoriedade de registro no M.S., de acordo com RDC nº 278 de 22 de setembro de 2005 – óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal – 4100158.

O produto foi mantido conforme orientado na embalagem em local limpo, seco e fresco, dentro da data de validade.

Atendimento ao consumidor: (16) 3263.9000

### **4.3 Agrupamento dos animais e administração da droga**

Os 24 animais foram divididos em dois grupos de 12: tratado, que recebeu diariamente vitamina D diluída em óleo de amendoim e controle, que recebeu apenas o veículo. Os animais foram identificados por meio de marcação com caneta em suas caudas e nomeados, conforme o grupo e numericamente em C1, C2,..., C12 para o grupo controle e T1, T2, ..., T12 para o grupo tratado. O método de administração oral foi gavagem, realizada por técnico do laboratório, único, com prática no manuseio dos animais. A duração do tratamento foi de 19 dias (19 doses), com dose alta de colecalciferol de  $37,5\mu\text{g/Kg}$  (equivalente a 1.500Ui/Kg ou 105.000Ui para um adulto de 70Kg) por dia, na diluição de 1 vit D (3.300UI): 1 óleo de amendoim. Os animais foram eutanaziados 24 h após a última administração da vitamina.

### **4.4 Avaliação dos animais enquanto vivos**

Os animais foram pesados nos dias 0, 3, 8, 11, 15 e 18, ou seja, no primeiro e no último dia da administração da vitamina/veículo e outras quatro vezes, durante o experimento.

### **4.5 Eutanásia e coleta do material**

Vinte e quatro horas após a última dose da vitamina/veículo, ou seja, após 19 doses, foi realizada a eutanásia dos animais com administração de cloridrato de cetamina (90 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg) seguida de deslocamento cervical. As carcaças dos animais foram colocadas em sacos brancos, contendo o símbolo de risco biológico, seguido de congelamento e incineração das mesmas.

---



No momento da eutanásia, aproximadamente 24 horas após a última gavagem, foi realizado procedimento cirúrgico com identificação das estruturas e exérese em bloco de parte dos órgãos pélvicos dos animais: terço superior da vagina, colo e terço inferior do útero (bicorno), terço superior da uretra e terço inferior da bexiga e tecido conjuntivo adjacente, de maneira a ter amostra representativa do ligamento uterossacro, conforme a figura 8.

Após a coleta, as amostras, que apresentavam aproximadamente 0,5 a 1cm no eixo longitudinal, foram imediatamente armazenadas a seco, individualmente, em tubos do tipo eppendorf no freezer a -80°C. Em momento oportuno, o material foi retirado do freezer, uma peça por vez, encaminhado em gelo seco do freezer à bancada do laboratório para iniciar os preparos dos tecidos, conforme o protocolo descrito a seguir.

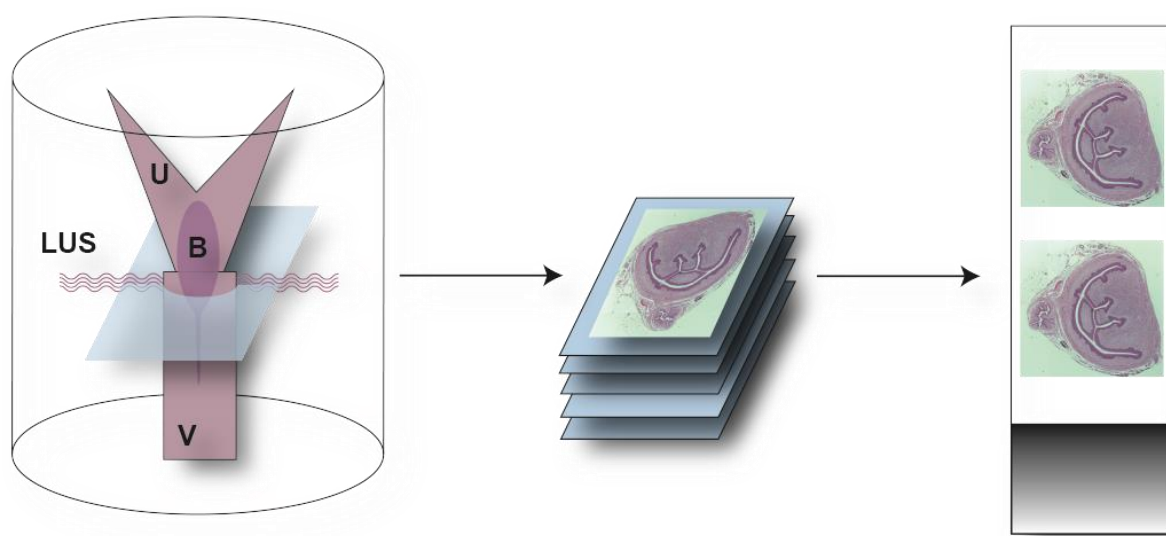
Uma visão geral sobre a utilização das amostras se faz necessária, pois diversas técnicas foram utilizadas, vide figura 9. A pesquisa teve início com 24 ratas: 12 para o grupo (C1 a C12) controle e 12 para o grupo tratado (T1 a T12) com a vitamina D. Todos os animais tiveram seus pesos aferidos e não houve perda de nenhum sujeito da pesquisa, até o momento da eutanásia. Nesta ocasião, as ratas tiveram a fase do ciclo estral determinada por citologia.

Após a coleta das amostras, 6 do grupo controle e 6 do grupo tratado foram encaminhadas para emblocamento com Tissue-Tek para aplicação da técnica de geração de segunda harmônica (SHG); com este material foram realizados cortes de 30 e 50 micrômetros para avaliação descritiva e quantitativa dos materiais. Houve perda de um tecido do grupo controle e de um tecido do grupo tratado, assim, para as avaliações com SHG, tivemos 5 sujeitos do grupo controle e 5 sujeitos do grupo tratado.

A outra parte das amostras, 6 do grupo controle e 6 do grupo tratado, foi encaminhada para preparo de lâminas com parafina para aplicação das técnicas de coloração (hematoxilina e eosina e Picrosírius) e de marcação (com anticorpos que serão especificados a seguir). Destes, uma amostra do grupo controle e uma do grupo tratado foram cortadas de forma longitudinal (diferente do padrão definido no estudo) e as outras, 5 do grupo controle e 5 do grupo tratado, foram

---

seccionadas em direção axial. Todas as amostras com cortes longitudinais e transversais foram submetidas a coloração por Picrosírius. Todas as amostras (6 controles e 6 tratados) do grupo enviado para preparo com parafina foram submetidas a coloração com hematoxilina e eosina.

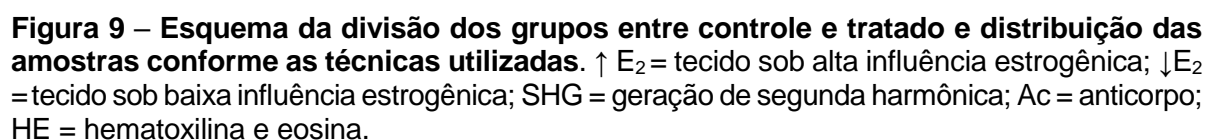


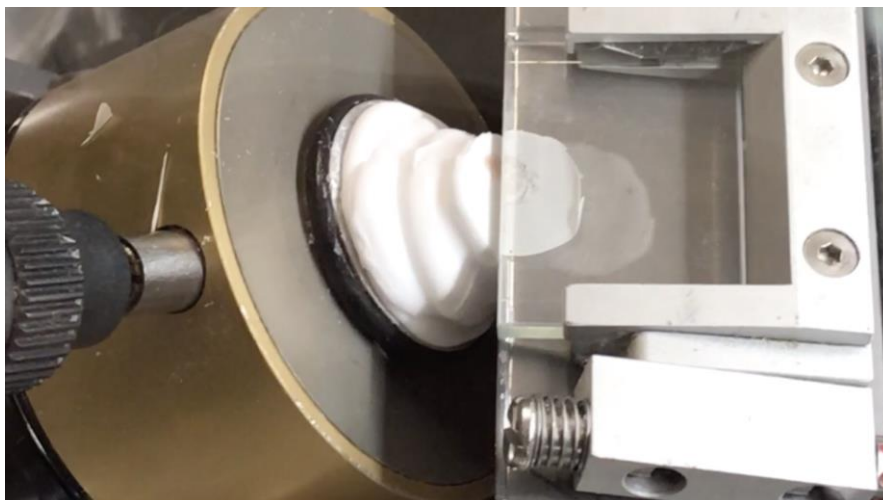
**Figura 8 – Esquema da amostra tecidual emblocada em Tissue-Tek.** À esquerda, tecido extraído das ratas emblocado em Tissue-Tek; no centro, cortes realizados em criostato; à direita, lâmina montada com os cortes. As letras indicam (V) vagina; (U) ureter; (B) bexiga; (LUS) ligamento uterossacro.

#### 4.6 Protocolo de descongelamento e preparo do material em Tissue-Tek

As peças foram descongeladas à temperatura ambiente, mergulhadas em PBS1X (tampão fosfato-salino ou *phosphate buffered saline* do inglês, um tampão ácido-base que tem como finalidade manter o pH constante, quando adicionado a outros meios; “1X” se trata da diluição da solução) e limpas (extração de tecidos excedentes de vagina, útero e gordura); em seguida foram fixadas em paraformaldeído 4% *overnight*, lavadas em PBS1X e incubadas em solução crioprotetora de sacarose em concentrações de 10% por 1 hora, 20% por 1 hora e 30% por 4 horas e, após 2 horas, os tecidos foram encaminhados para a geladeira

```
graph TD; A[Controle 12 ratos] --> B((Óleo de amendoim)); B --> C[18 dias]; C --> D[37,5 µg/Kg/dia]; E[Vitamina D 12 ratos] --> F((Vitamina D + Óleo de amendoim)); F --> C; C --> D; D --> G[Extração do tecido de interesse];
```





**Figura 10 – Tecido emblocado em Tissue-Tek sendo seccionado no criostato.**

#### **4.7 Protocolo de secção e padronização dos cortes em Tissue-Tek**

As peças emblocadas em Tissue-Tek foram retiradas do freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  e, imediatamente, depositadas dentro do Criostato a  $-26^{\circ}\text{C}$ ; cortes transversais de  $30\mu\text{m}$  no sentido cranial foram realizados e analisados em microscópio de luz convencional, sem corantes, até identificada a região de interesse, em que se observa a luz vaginal, a luz do colo uterino e a porção ligamentar representativa dos ligamentos uterossacos próximo à sua inserção. As lâminas, sem processos de fixação, eram então armazenadas em geladeira a  $-20^{\circ}\text{C}$ , enquanto não eram utilizadas.

#### **4.8 Protocolo de secção e padronização dos cortes em parafina**

Cada peça foi colocada em um frasco de vidro identificado e contendo formol diluído a 10% em tampão fosfato de sódio (PBS – 0,1M, pH 7,4). O fixador ficou em contato com a peça por 12 horas, à temperatura ambiente. Após o período de fixação, as peças foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizadas pelo xilol e impregnadas pela parafina líquida em estufa regulada à temperatura de  $60^{\circ}\text{C}$ , segundo o método preconizado por Michalany (1980).

Em seguida, as peças foram incluídas em parafina (o tecido embebido em parafina foi colocado a 58°C por 15 minutos e, então, posicionado no *cassete*, mantendo o eixo longitudinal da peça perpendicular ao eixo longitudinal do *cassete*). O tecido no molde foi transferido para uma placa fria até solidificar a parafina que, então, foi destacada do molde. O bloco de parafina, com o tecido corretamente posicionado, foi inserido no micrótomo de forma a manter o eixo longitudinal da peça perpendicular à lâmina. Cortes espessos (de 10 a 30  $\mu\text{m}$  foram feitos até identificar a região de interesse (altura de corte) e, então, os cortes foram reduzidos para 4  $\mu\text{m}$ . Os melhores cortes foram selecionados e depositados em lâminas para posterior análise.

#### **4.9 Preparo do material para análise em microscopia**

##### **4.9.1 Protocolo de preparo da lâmina para microscopia com geração de segunda harmônica**

As lâminas contendo os cortes preparados em Tissue-Tek foram lavadas em PBS1X uma vez, até que o Tissue-Tek fosse removido por completo. Água destilada foi depositada sobre cada tecido na lâmina, em seguida uma lamínula foi colocada, cuidadosamente, sobre os tecidos e selada com solução de silicone para evitar o ressecamento da amostra.

##### **4.9.2 Protocolo de preparo da lâmina para Picrosirius**

Após desparafinados e hidratados, os cortes foram mergulhados no corante (*sirius-Red*, com ácido pícrico) picrosirius por 30 minutos. As lâminas foram então lavadas em água acidificada (HCl 0,01N) por 2 minutos 1X e o excesso de água foi retirado mecanicamente (lavagem em água corrente 8-10 min). Os tecidos foram, então, desidratados em etanol 70, 95% e 3X absoluto (3 min em cada) e diafanizados em xileno (3X) e montados em meio com resina sintética (Entellan, Merck).

---

#### **4.9.3 Protocolo de preparo da lâmina para Hematoxilina e Eosina**

Os tecidos foram desparafinados, hidratados e corados em coloração em hematoxilina de Harris; em seguida foi colocada a lamínula em meio com resina sintética (Entellan, Merck).

#### **4.9.4 Protocolo de preparo da lâmina para imunofluorescência**

Inicialmente, foi realizada a recuperação antigênica dos cortes histológicos, utilizando tampão citrato de sódio (10 mM de citrato, 2 mM EDTA e Tween 20 a 0,05% em pH 6,2). As lâminas contendo os cortes histológicos foram colocadas em banho maria e aquecidas dentro do tampão citrato de sódio, mantidas por 15 minutos em ebulição e, depois, resfriadas por 10 minutos, em temperatura ambiente. As lâminas foram secas e os cortes foram contornados com uma caneta específica (formação de barreira hidrofóbica) para evitar que as soluções seguintes, a serem incubadas, extravasassem para fora da região do tecido.

Após a etapa de recuperação antigênica, os tecidos foram incubados com a solução de PBS-glicina por 15 minutos, com a finalidade de bloquear grupos aldeídicos livres (possível sítio de reconhecimento pelos anticorpos) que são gerados na amostra biológica, após a etapa de fixação com paraformaldeído.

Os tecidos foram incubados com a solução de bloqueio (BSA 5% e triton 3%) por uma hora, lavados duas vezes em PBS, e incubados com anticorpo primário (por uma hora para alfa-actina e AH; *overnight* para fibronectina, elastina, fibroblasto e vimentina) ou com WGA-488. Os tecidos foram, novamente, lavados em PBS duas vezes e incubados com anticorpo secundário por uma hora. Em seguida, houve nova lavagem dos tecidos, incubação com o marcador DAPI (visualização do núcleo) por 30 minutos, duas lavagens com PBS, e finalização da imunomarcacão com meio de montagem não fluorescente (*Fluoromount G - Electron Microscopy Sciences*) e lamínulas de vidro sobre os tecidos.

Os tecidos preparados com saponina por uma hora (em solução com PBS1X com 0,2% de saponina e 1% de BSA), colocados por 15 minutos em PBS glicina, lavados duas vezes em PBS1X, bloqueados por 1 hora, lavados mais duas vezes

---

em PBS glicina, acrescidos do anticorpo primário *overnight*, lavados duas vezes em PBS1X, acrescidos da coloração para DAPI por 30 minutos, lavados mais duas vezes em PBS1X, embebidos em meio não fluorescente (Fluoromount G - Electron Microscopy Sciences) e as lâminas foram, então, seladas. Os experimentos foram realizados por metodologias desenvolvidas por Cavalheiro et al.<sup>(124)</sup>

Os anticorpos utilizados para imunofluorescência estão descritos na tabela 6. A análise do material foi realizada com microscópio confocal (Leica TCS SP8).

**Tabela 6** – Anticorpos utilizados para imunofluorescência e suas diluições

Anticorpo	Detergentes reagentes para permeabilização celular	Diluição	Identificação	Anticorpo secundário	Diluição do Ac secundário
Fibronectina ab	Triton	1:250	N20; cód SC 6953	Goat	1:300 / 594
WGA	Triton	1:250	Life Technologies	-	-
Ácido hialurônico	Saponina	1:100	Glicosp laboratório de glicobiologia – Unifesp	STP	1:400 / 594
Alfa-actina	Triton	1:250	14A; cód: SC 32251	Mouse	1:300 / 594
Fibroblasto	Saponina	1:200	ER-TR7; cód: SC 73355	Rat	1:300 / 594
Vimentina	Saponina	1:200	S20; cód: SC 7558	Goat	1:300 / 594
Heparam sulfato	Saponina	1:100	10EA; cód: H1890	Mouse	1:300
DAPI	Diluído em água destilada	1:500	Life Technologies	-	-
Elastina	Autofluorescência	-	-	-	488

#### 4.10 Avaliação do ciclo estral

Os ratos foram avaliados quanto à fase do ciclo estral, por meio de citologia vaginal realizada, imediatamente, após a eutanásia e por meio de histologia.

#### 4.11 Microscopia com geração de segunda harmônica

Os parâmetros de detecções da geração de segunda harmônica das fibras de colágeno podem ser visualizados nas Tabelas 7 e 8. O sistema consiste em um microscópio invertido (DMI 6000 CS Trino, Leica) equipado com uma fonte de luz ajustável *picoEmerald* (APE). O feixe de luz foi focado, usando uma objetiva plana de multi-imersão apocromática (HC PL APO CS2). As imagens foram representadas pela projeção máxima de intensidade, correspondendo aos planos confocais das séries-Z. Para os cortes de 30 $\mu$ m analisados foram utilizados os parâmetros da tabela 7. Os experimentos foram realizados por metodologias desenvolvidas por Cavalheiro et al.<sup>(124)</sup>

**Tabela 7** – Parâmetros utilizados na microscopia confocal com geração de segunda harmônica nos cortes de 30 micrometros

Objetiva	Espessura do corte ( $\mu$ m)	Zoom	EPI/F	Pinhole	Gain	SHG Laser	Planos
10X	30	1	F	1	848	70	30
20X	30	1,5	F	1	912	70	30
40X	30	0,75	EPI	1	650	70	30

Durante a análise do material de 30 micrômetros, em microscopia confocal com geração de segunda harmônica, observou-se que a padronização para cortes espessos (EPI) oferecia melhor resultado visual na utilização da objetiva de 40X.

Para os cortes de 50 $\mu$ m analisados foram utilizados os seguintes parâmetros:

**Tabela 8** – Parâmetros utilizados em microscopia confocal com geração de segunda harmônica nos cortes de 50 micrometros

Objetiva	Espessura do corte ( $\mu$ m)	Zoom	EPI/F	Pinhole	Gain	SHG Laser	Planos
20X	50	0,75	F/EPI	1	680	70	150



#### 4.12 Imunofluorescência

As imagens foram capturadas, utilizando um microscópio confocal (Leica TCS SP8) equipado com uma objetiva plana-apocromática (objetiva e abertura numérica descritas na tabela; quando utilizadas as objetivas de x40 e x63, a captura foi feita com imersão em óleo). As imagens estão representadas na intensidade máxima de projeção, correspondendo à soma dos planos das imagens confocais (z-series). As imagens foram processadas utilizando o software ImageJ.

Os cortes de 4 $\mu$ m foram marcados para imunofluorescência, utilizando os parâmetros e marcadores conforme tabela 9.

**Tabela 9** – Parâmetros utilizados em microscopia confocal para imunofluorescência

Objetiva	Espessura do corte ( $\mu$ m)	Zoom	EPI/F	Pinhole	Planos
<b>Elastina</b>					
10X	4	0,75	F	1	30
63X	4	1,5	EPI	1	30
<b><math>\alpha</math>-actina</b>					
10X	4	0,75	F	1	30
63X	4	1,5	EPI	1	30
<b>Fibronectina</b>					
10X	4	0,75	F	1	30
63X	4	1,5	EPI	1	30
<b>Fibroblasto</b>					
10X	4	0,75	F	1	30
63X	4	1,5	EPI	1	30
<b>Vimentina</b>					
10X	4	0,75	F	1	30
63X	4	1,5	EPI	1	30
<b>Ácido hialurônico</b>					
10X	4	0,75	F	1	30
63X	4	1,5	EPI	1	30
<b>Heparam sulfato</b>					
10X	4	0,75	F	1	30
63X	4	1,5	EPI	1	30

#### 4.13 Quantificação de sinais

As imagens adquiridas por geração de segunda harmônia e por coloração com Picrosirius foram transformadas em dados quantificáveis, por meio da informação de intensidade de pixel (quantificação de sinal), utilizando o *software* ImageJ.

Para as imagens de SHG com 50 micrometros, uma amostra de cada grupo foi utilizada (controle sob baixa ação estrogênica, tratado sob baixa ação estrogênica, controle sob alta ação estrogênica e tratado sob alta ação estrogênica). Para cada imagem foi realizada a leitura em três diferentes regiões: lâmina própria, muscular e ligamentar, com quantificação de pixels relativa à área selecionada.

Para as imagens de Picrosirius, com 4 micrometros, foi realizada a leitura do sinal em vermelho e em verde, representativos dos colágenos tipo I e III, respectivamente. Neste caso, havia amostras de três animais nos grupos controle, sob baixa ação estrogênica e tratado sob alta ação estrogênica e de dois animais, nos grupos controle, sob alta ação estrogênica e tratado sob baixa ação estrogênica. Em cada um dos grupos que continha apenas dois animais, um destes possuía duas lâminas, ambas as quais foram utilizadas para que atingíssemos N de 3 para os cálculos estatísticos.

---

## 5 RESULTADOS

---

### 5.1 Peso dos animais

Os animais são identificados nas tabelas e gráficos como: CT (grupo controle) e VitD (grupo que recebeu vitamina D).

**Tabela 10** – Identificação dos grupos para avaliação do peso em gramas no 18 dia do experimento

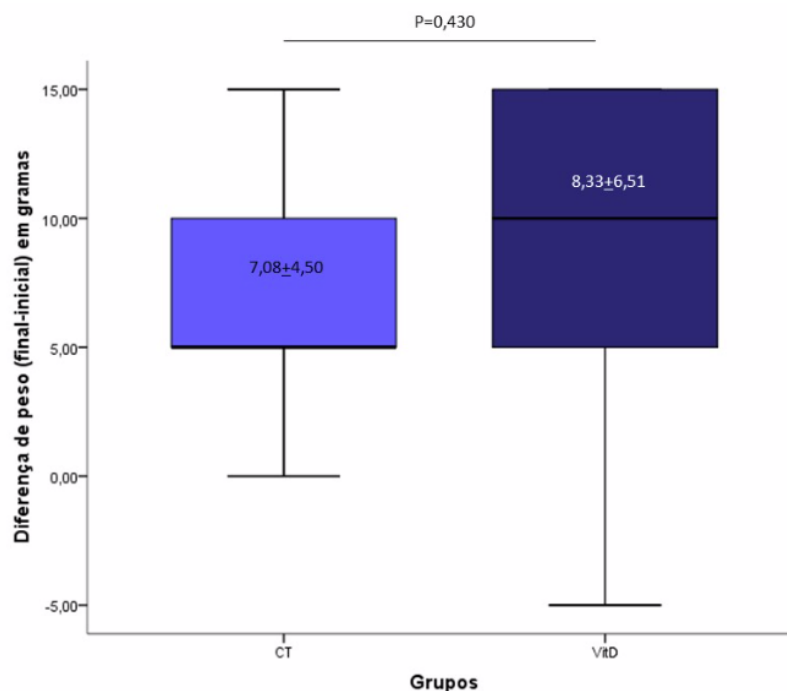
Grupos	N	Observação
CT	12	12 animais (1 leitura para cada animal)
VitD	12	12 animais (1 leitura para cada animal)

A seguir são apresentadas tabela e gráfico *boxplot* comparativos entre os grupos, em relação às medidas de peso (em gramas), realizadas nos dias 0 (zero) e 19 (Tabela 11 e Figura 11). Não foi levada em consideração a fase do ciclo em que os animais estavam, para esta avaliação.

Devido ao tamanho amostral reduzido, a comparação entre os grupos foi realizada, utilizando o teste estatístico não paramétrico para comparação de médias Mann-Whitney. Valores de  $p < 0,05$  são considerados estatisticamente significantes.

**Tabela 11** – Descrição dos grupos de estudo em relação à medida de peso (gramas)

Grupos	N	Peso inicial	Peso final	Diferença (final-inicial)
CT	12	210,00±7,69	217,08±9,88	7,08±4,50
VitD	12	210,83±11,25	219,17±10,41	8,33±6,51
P		0,929	0,539	0,430



**Figura 11** – Comparação da medida de diferença do peso de ratas nos grupos controle (CT) e tratado com vitamina D (VIT D).

Os valores apresentados referem-se à média e desvio padrão da medida da diferença do peso (gramas) de cada grupo.

Não houve variação significativa na diferença do peso das ratas entre os grupos controle e tratado.

## 5.2 Avaliação do epitélio vaginal

Para a medida do epitélio, foram realizadas 10 aferições da espessura para cada animal e selecionadas as três menores medidas para cálculos. Os animais são identificados nas tabelas e gráficos como: CT (grupo controle) e VitD (grupo que recebeu vitamina D). E2 identifica a ação estrogênica (alta ou baixa) no tecido, conforme a fase do ciclo estral.

**Tabela 12** – Descrição dos grupos de estudo em relação à medida do epitélio vaginal

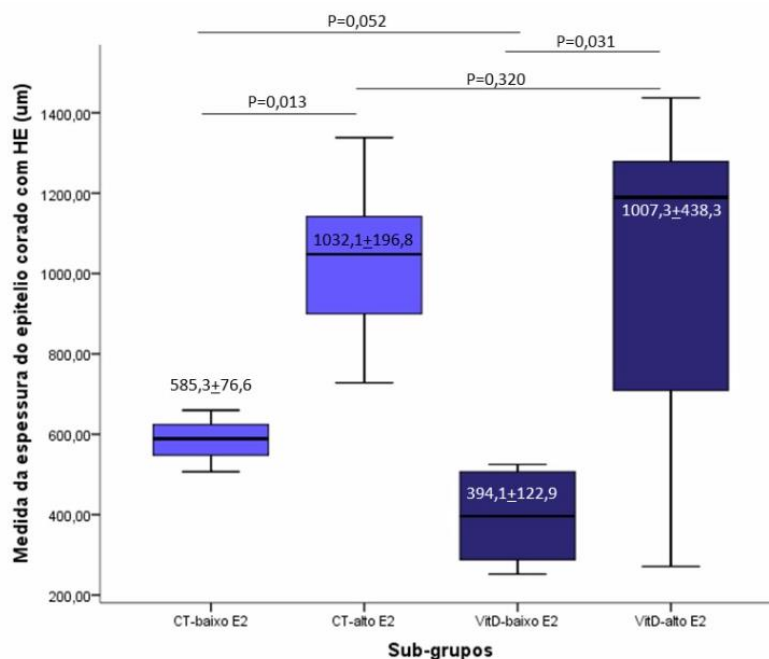
Grupos	N considerado para cálculos estatísticos	Observação N (número de leituras por animal)
CT-baixo E2	3	1 animal (3 leituras para cada animal)
CT-alto E2	9	3 animais (3 leituras para cada animal)
VitD-baixo E2	6	2 animais (3 leituras para cada animal)
VitD-alto E2	12	4 animais (3 leituras para cada animal)

A seguir, são apresentadas tabela e gráfico *boxplot* comparativos entre os sub-grupos em relação às medidas de epitélio corado por HE (Tabela 13 e Figura 12).

Devido ao tamanho amostral reduzido, a comparação entre os grupos foi realizada, utilizando o teste estatístico não paramétrico para comparação de médias Mann-Whitney. Valores de  $p < 0,05$  são considerados estatisticamente significantes.

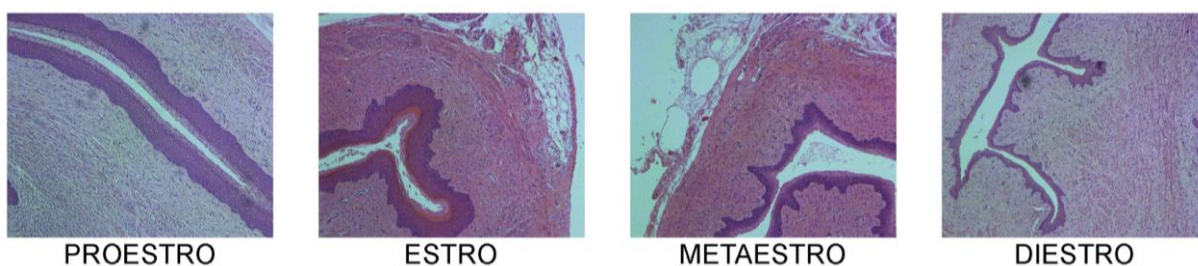
**Tabela 13** – Descrição dos grupos de estudo em relação à medida do epitélio (micrômetro) corado por HE

Sub-Grupos (epitélio HE)	N	Média	Desvio Padrão
CT-baixo E2	3	585,33	76,57
CT-alto E2	9	1032,11	196,83
VitD-baixo E2	6	394,17	122,98
VitD-alto E2	12	1007,33	438,32



**Figura 12** – Comparação da medida do epitélio vaginal de ratas corado por HE.

Comparação da medida do epitélio vaginal de ratas, corado por HE, divididas por fase de baixa ou alta ação estrogênica do ciclo estral (baixo E2 e alto E2, respectivamente), nos grupos controle (CT) e tratados com vitamina D (VIT D). Os valores apresentados referem-se à média e desvio padrão da medida do epitélio, corado por HE de cada subgrupo.



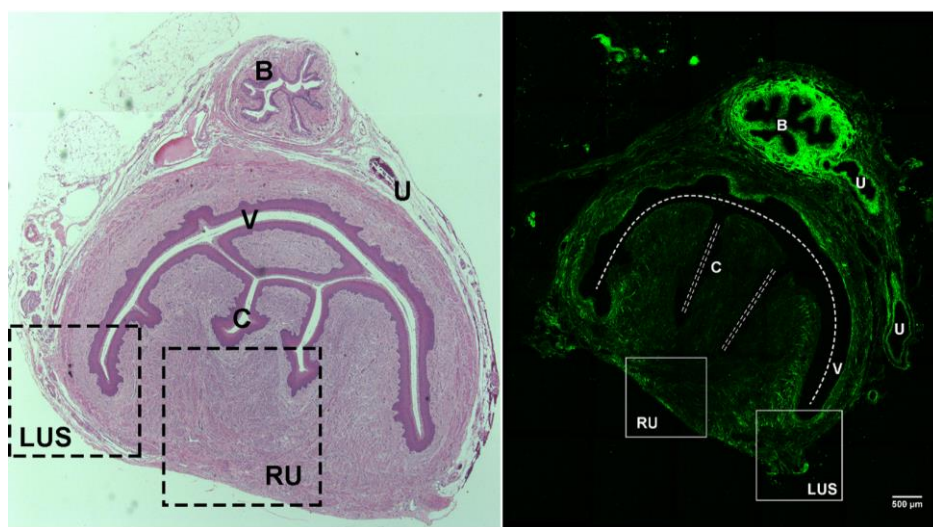
**Figura 13** – Epitélio vaginal das ratas conforme fase do ciclo estral.

A figura 13 representa os epitélios das ratas, corados por HE, identificando as fases estrais sob alta ação estrogênica (proestro e estro) e sob baixa ação estrogênica (metaestro e diestro).

Houve, conforme o esperado, presença de epitélio mais espesso nas ratas na fase estral de maior influência estrogênica (proestro e estro) e menos espesso nas ratas em fase de baixa atividade estrogênica (diestro e metaestro) (Figura 13). A diferença estatística se deu entre os grupos sob baixa e alta atividade estrogênica, tanto nos controles quanto nos tratados.

### 5.3 Microscopia com geração de segunda harmônica

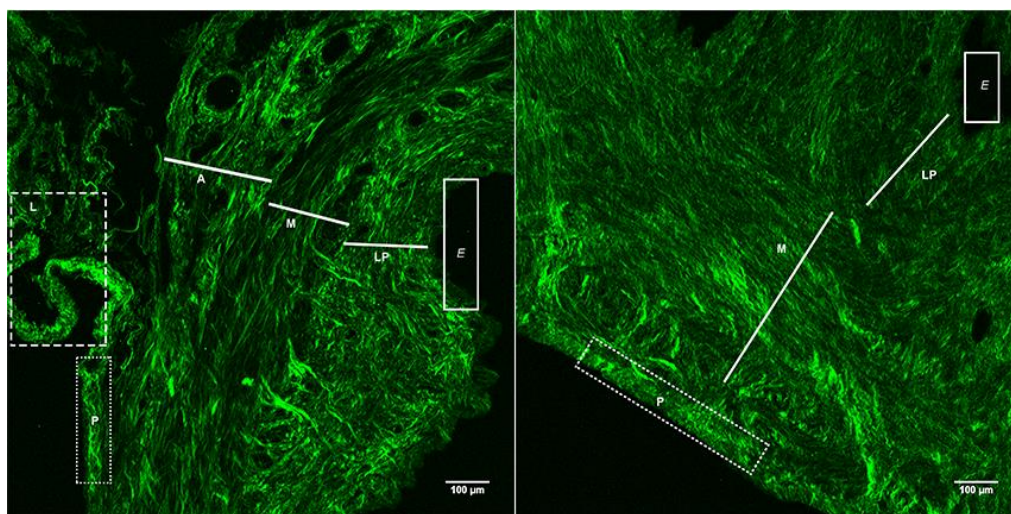
As imagens da figura 14 foram montadas para representar o corte completo em HE e em SHG. A coloração em HE é referência para a posterior análise das imagens geradas por microscopia com SHG e imunofluorescência para melhor identificação das regiões histológicas.



**Figura 14 – Corte completo em HE em aumento de 2,5X (esquerda) e SHG em aumento de 10X (direita).** À esquerda, imagem de microscopia comum em coloração HE em objetiva com aumento de 2.5X (montagem para demonstração do corte inteiro). A figura representa tecido de rata em proestro, estágio do ciclo em que há alta ação estrogênica. À direita, imagem por microscopia confocal utilizando o método de geração de segunda harmônica (SHG), em objetiva de 10X, com montagem de diversas fotografias, representando o tecido completo. As letras indicam (V) luz vaginal; (C) luz do colo uterino; (U) ureter; (B) bexiga. Estão identificadas também as regiões de interesse do estudo: (RU) região retrouterina e (LUS) região proximal do ligamento uterossacro. Esta imagem foi ajustada para melhor visualização da estrutura observada, portanto, não é representativa da real quantidade de sinal registrada pelo *software*.



Observamos que o epitélio, bem marcado na coloração por HE (Figura 14), não aparece nas imagens por SHG, já que nesta região do tecido não há colágeno. As regiões com imagens mais evidentes (bexiga e ureter) apresentam maior quantidade de sinal e, portanto, interpreta-se como presença de maior quantidade de colágeno.

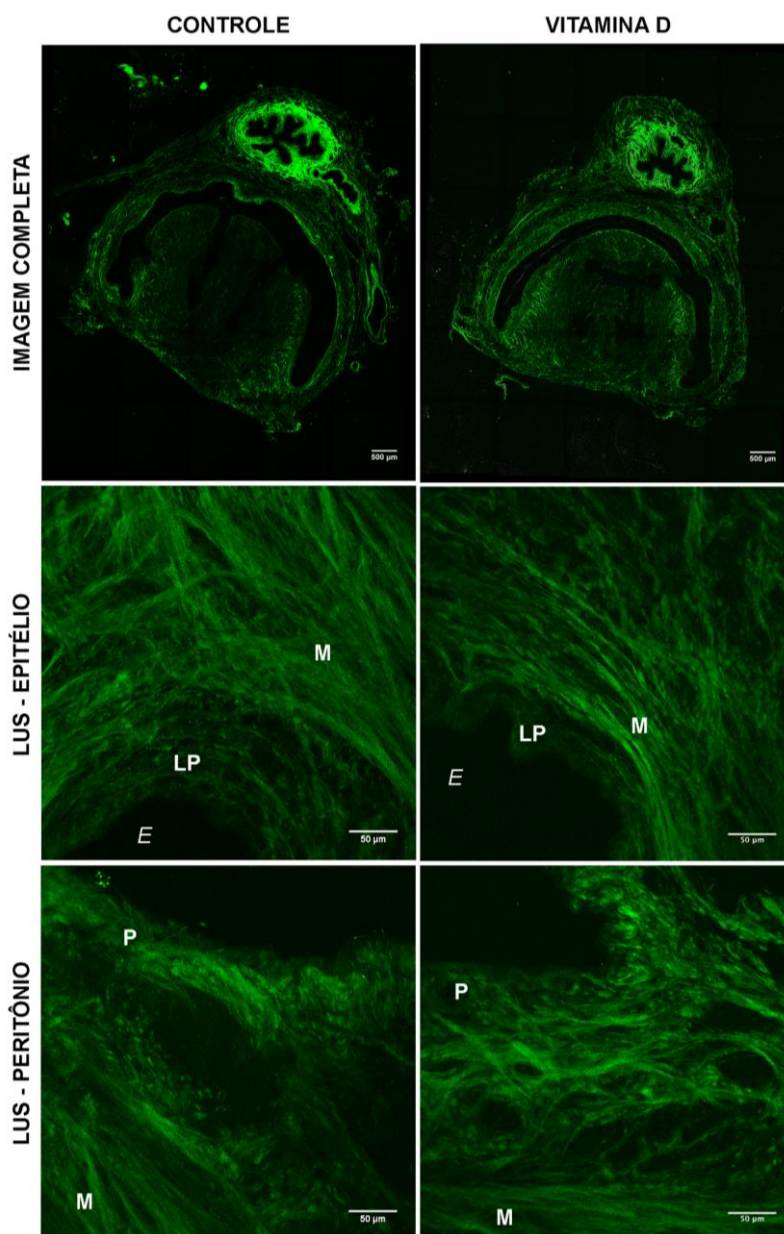


**Figura 15 – Corte das regiões do ligamento uterossacro e retrouterina por SHG com aumento de 10X.** Imagem por microscopia confocal com SHG, em objetiva de 10X, representando apenas a região do ligamento uterossacro, à esquerda, e apenas a região retrouterina, à direita. Observa-se, na figura, as regiões que correspondem às camadas/estruturas: (L) ligamento uterossacro, (P) peritônio, (E) epitélio, (M) muscular, (A) adventícia, (LP) lâmina própria. Esta imagem foi ajustada para melhor visualização da estrutura observada, portanto, não é representativa da real quantidade de sinal registrada pelo *software*.

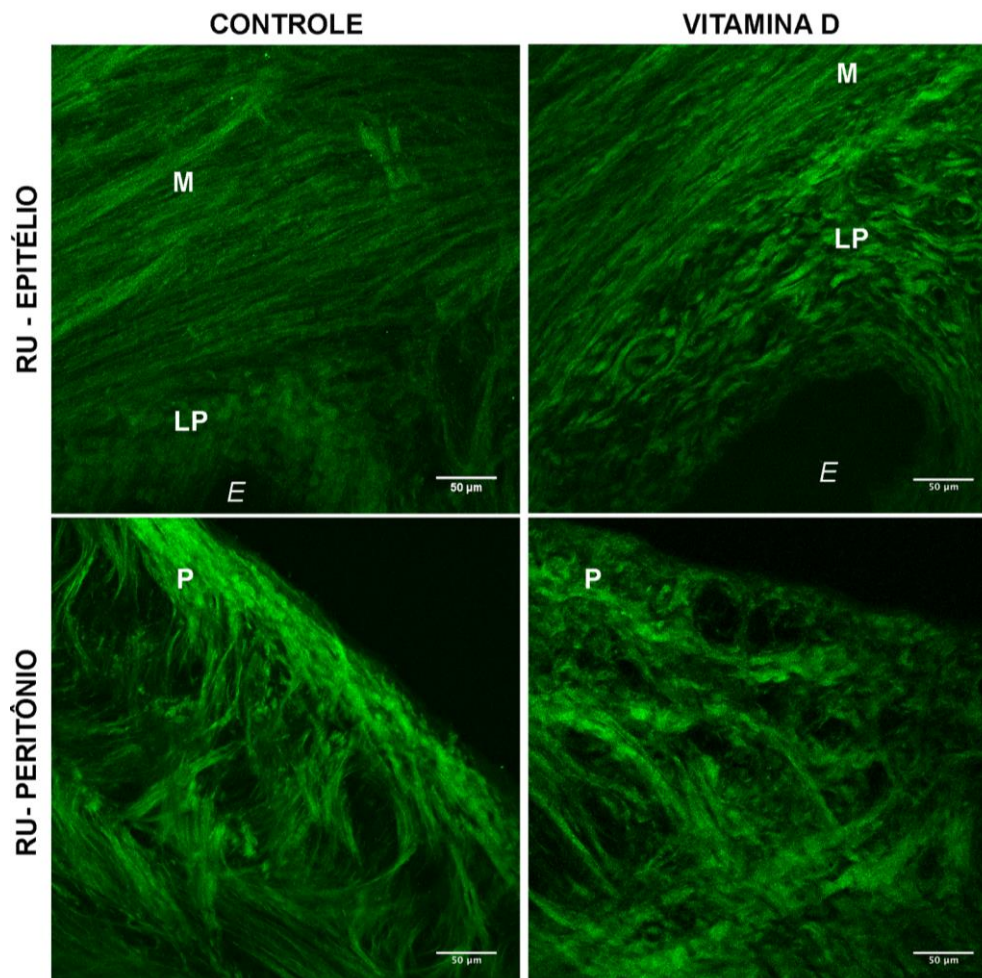
Podemos observar na figura 15 um corte adquirido com objetiva de 10X em microscopia confocal com SHG; o sinal verde representa as fibras colágenas (colágeno total, sem diferenciação entre os tipos de colágeno). Essa imagem também terá valor de referência das camadas histológicas para as imagens em maior aumento sob a mesma técnica. Note que a determinação histológica de cada camada na imagem por SHG é aproximada, já que não há coloração correspondente ao mesmo corte para identificação acurada, dessas regiões histológicas.

As imagens apresentadas até agora não têm valor para análise acurada da arquitetura da matriz extracelular dos tecidos, apenas para referência no momento da análise das imagens em maior aumento.

Nas figuras 16 e 17, os cortes com objetiva de 40X mostraram-se ideais para análise da organização das fibras colágenas na MEC do tecido de interesse.



**Figura 16 – Imagens por SHG, da região do ligamento uterossacro de ratas com aumento de 10x e de 40x.** Imagem por microscopia confocal por SHG. Na linha superior, por objetiva de 10X, em montagem, representando o corte completo do tecido. Nas linhas inferiores observamos, por aumento de 40X, a região do ligamento uterossacro: linha intermediária engloba epitélio, lâmina própria e muscular; linha inferior engloba peritônio e muscular. As letras indicam: (P) peritônio, (E) epitélio e (LP) lâmina própria e (M) muscular. As imagens são representativas de comundongos na mesma fase do ciclo estral, proestro, em que há alta ação estrogênica local. Esta imagem foi ajustada para melhor visualização da estrutura observada, portanto, não é representativa da real quantidade de sinal registrada pelo software.



**Figura 17 – Imagens por SHG, da região retrouterina de ratas com aumento de 40X.** Imagem por microscopia confocal por SHG. Observamos, em aumento de 40X, a região retrocervical. Na linha superior vemos epitélio, lâmina própria e parte da muscular; na linha inferior observa-se o peritônio e parte da muscular. As letras indicam: (P) peritônio, (E) epitélio, (LP) lâmina própria e (M) muscular. As imagens são representativas de ratas na mesma fase do ciclo estral, proestro, em que há alta ação estrogênica local. Esta imagem foi ajustada para melhor visualização da estrutura observada, portanto, não é representativa da real quantidade de sinal registrada pelo *software*.

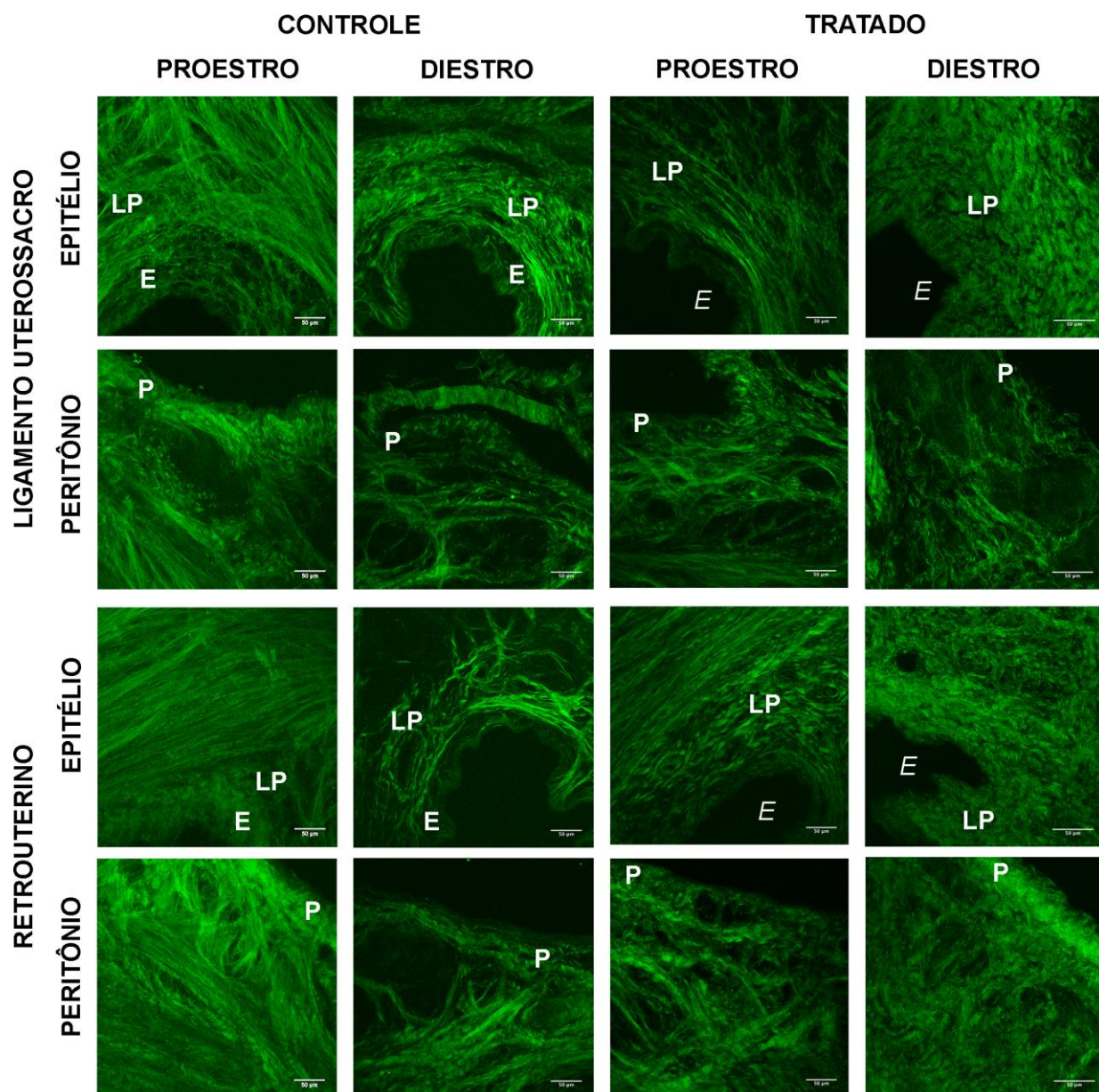
Essa imagem, com as fotografias feitas com aumento de 40X, apresenta minudências da organização arquitetural da matriz extracelular, no que diz respeito às suas fibras colágenas (em verde). Pode-se identificar, de maneira aproximada, as regiões histológicas: lâmina própria, muscular (não representada suficientemente nessas imagens) e peritônio, sem, no entanto, definir seus limites; assume-se que a porção mais centrípeta sem sinal represente o epitélio (que não apresenta colágeno).

De maneira geral a camada muscular evidencia fibras mais compactas, alinhadas em direção preferencial, quando comparadas às outras camadas. A camada epitelial não apresenta fibras colágenas e mostrou-se, portanto, sempre com ausência de sinal. Na lâmina própria e adventícia, as fibras aparentavam mais “soltas”, com mais espaço entre elas, mais “enrugadas” se comparadas à muscular e mantendo o aspecto de tecido de cestaria. Quanto mais afastadas do epitélio, as fibras adquiriram aspecto em malha, com conexões transversais, unindo o estroma ao peritônio nas regiões retrouterina e do ligamento uterossacro, nesta região, ainda mais soltas, desorganizadas e sem uma direção preferencial.

Também foram avaliados os tecidos, dentro dos grupos controle e tratado, separadamente, conforme a fase do ciclo estral (Figura 18).

---





**Figura 18 –** Imagens por SHG, com aumento de 40X para análise dos tecidos em diferentes fases do ciclo estral, do grupo controle (duas colunas da esquerda) e do grupo tratado (duas colunas da direita). Imagem por microscopia confocal por SHG. Observamos, em aumento de 40X, as regiões do ligamento uterossacro e retrouterino. Esta imagem foi ajustada para melhor visualização da estrutura observada, portanto, não é representativa da real quantidade de sinal registrada pelo *software*.

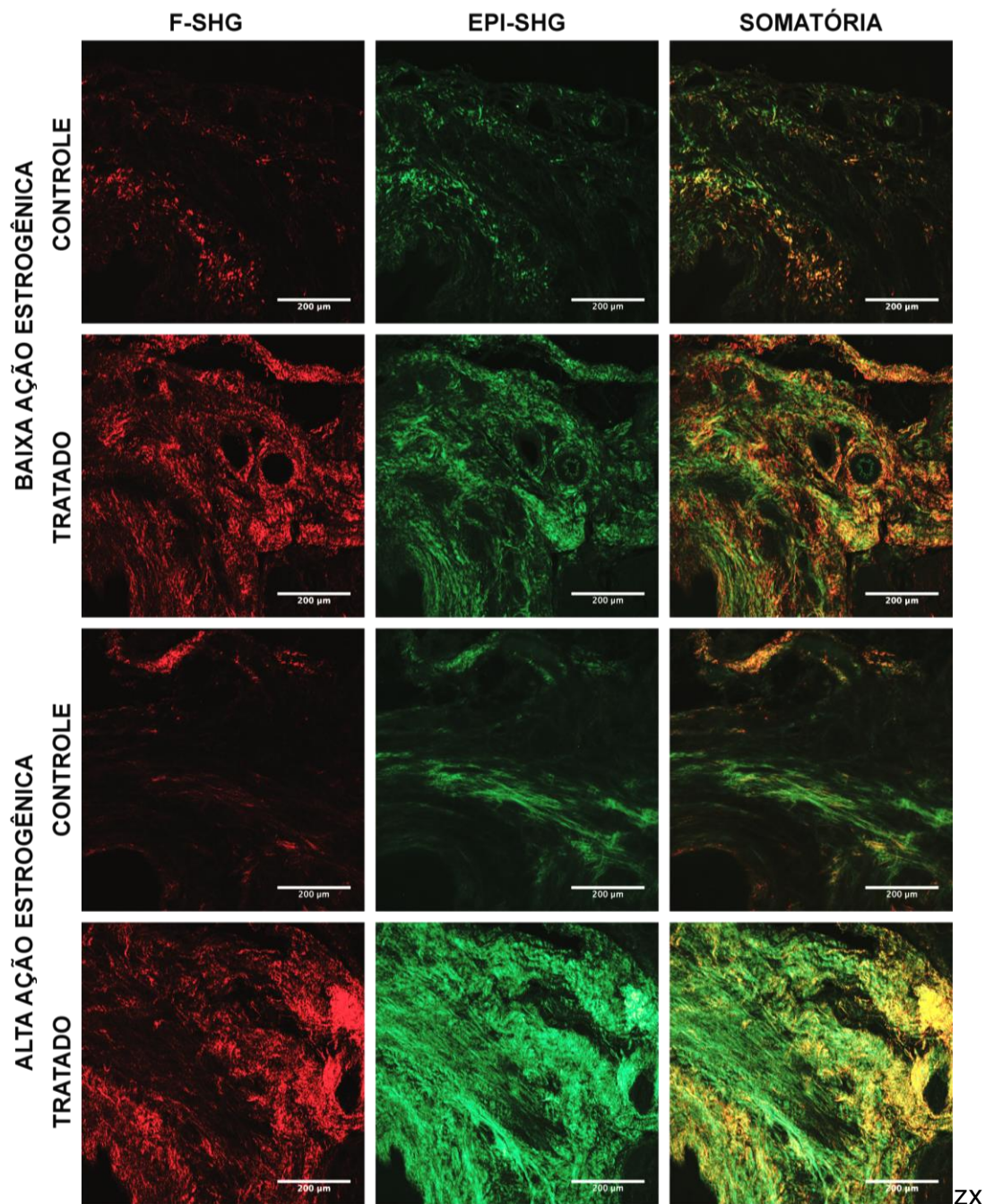
No grupo controle (Figura 18), os tecidos sob maior influência estrogênica apresentaram menos espaços vazios entre as fibras de colágeno e mais ramificações quanto mais afastadas do epitélio; na lâmina própria há mais imagens granulares e, na camada muscular, as fibras têm aspecto mais retilíneo, organizadas bem próximas umas das outras seguindo uma mesma direção, especialmente na porção retrouterina. Na região ligamentar propriamente dita, o colágeno se mostra com organização aleatória em todos os grupos.

Comparando os grupos, os animais tratados apresentavam característica mais “enrugada” e mais densa das fibras, não necessariamente compactas.

No grupo tratado (Figura 18), as imagens são semelhantes entre si, há discretamente mais espaço entre as fibras no grupo em proestro (coluna da esquerda). As fibras se mostram mais ramificadas próximas ao peritônio, característica que talvez esteja evidenciada por mostrarem-se menos espessas. A camada muscular parece apresentar fibras mais paralelas, destacando-se das outras camadas de uma forma mais evidente no grupo em proestro.

Além dos cortes com aumento de 40X, outros cortes, agora com 50 micrômetros e aumento de 20X, foram realizados para quantificação de sinal de colágeno (Figura 19) em que podemos visualizar a região do ligamento uterossacro com as camadas: epitélio, lâmina própria, muscular, adventícia e o ligamento propriamente dito.

---

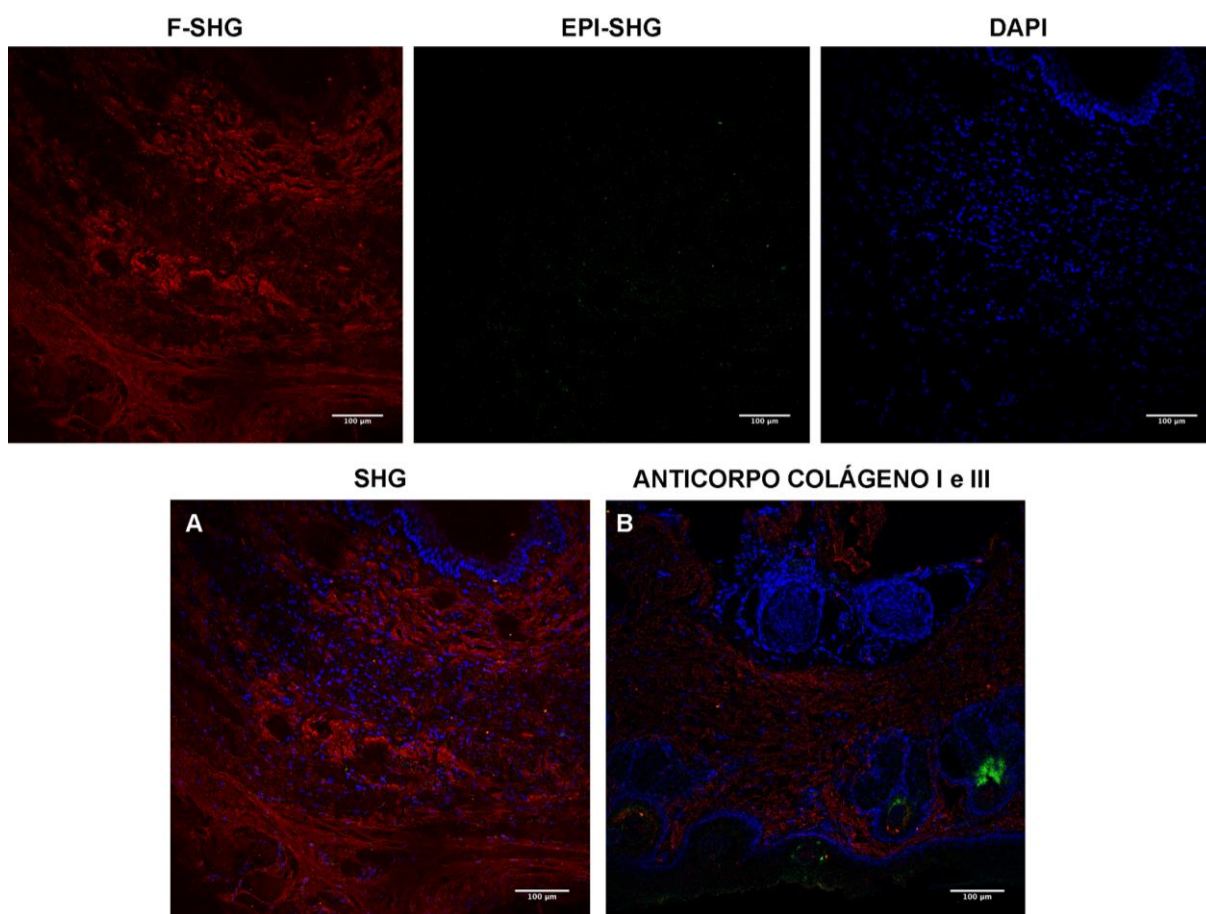


**Figura 19 – Imagens por SHG, de cortes de 50 micrômetros, com aumento de 20X, usados para quantificação de sinal de colágeno total.** Colágeno total por geração de segunda harmônica com objetiva de 20x evidenciando as detecções anterior (F-SHG) e posterior (EPI-SHG) em ratas sob baixa e alta ação estrogênica. Esta imagem não foi manipulada para melhor visualização da estrutura observada (colágeno), dessa forma, podemos interpretar a maior intensidade ou o maior brilho da imagem como representativo de maior quantidade de colágeno no tecido. Discreta quantidade de sinal da autofluorescência foi captada nas imagens (o que podemos ver no delineamento da parede interna de alguns vasos, o que provavelmente representa a elastina).



Nesta imagem facilmente podemos observar maior quantidade de sinal nos grupos tratados quando comparados aos grupos controle. Na maior parte das imagens, os sinais detectados, anterior (F-SHG) e posteriormente (EPI-SHG) se sobrepõem (coluna da direita). Algumas características em relação ao aspecto de maior ou menor enovelamento das fibras ainda podem ser observadas, mesmo nestas imagens em menor aumento.

Também foi realizada comparação entre os sinais gerados pelo colágeno pelas técnicas SHG e marcação com anticorpos (para colágeno I e colágeno III) (Figura 20).



**Figura 20 – Imagem de corte transversal da cauda de um dos ratos, sob as técnicas SHG e marcação com anticorpos, para comparação dos sinais gerados pela presença de colágeno nos tecidos.** Imagem obtida por SHG de corte transversal da cauda de um rato na junção entre os terços médio e distal, com captura da imagem anterior ou F-SHG (vermelho) e posteriormente ou EPI-SHG (verde); e com marcação para células (DAPI, em azul). Abaixo, temos o mesmo corte com as 3 imagens por SHG superiores mescladas, à esquerda, e imagem com marcação para colágeno I (vermelho), III (verde) e DAPI (azul), à direita.



A figura 20 representa o corte transversal da cauda de um rato, região em que se encontra apenas colágeno tipo I, utilizada para comparação com as imagens do tecido de interesse da pesquisa. Adquirido por SHG, no corte abaixo e à esquerda (A) observa-se nítido sinal captado anteriormente (vermelho) e escasso sinal captado posteriormente (verde). Na imagem abaixo e à direita, temos o tecido marcado para colágeno tipo I (vermelho) e III (verde, apenas ruído). A diferença entre as imagens adquiridas por F-SHG e EPI-SHG talvez possam identificar os tipos de colágeno, no entanto, mais testes são necessários.

Com os cortes de 50 micrômetros avaliados por SHG, realizamos a quantificação do colágeno. A seguir são apresentadas tabelas e gráficos *boxplot* comparativos entre os sub-grupos em relação as medidas de colágeno por SHG (Tabelas 14 e 15 e Figura 21).

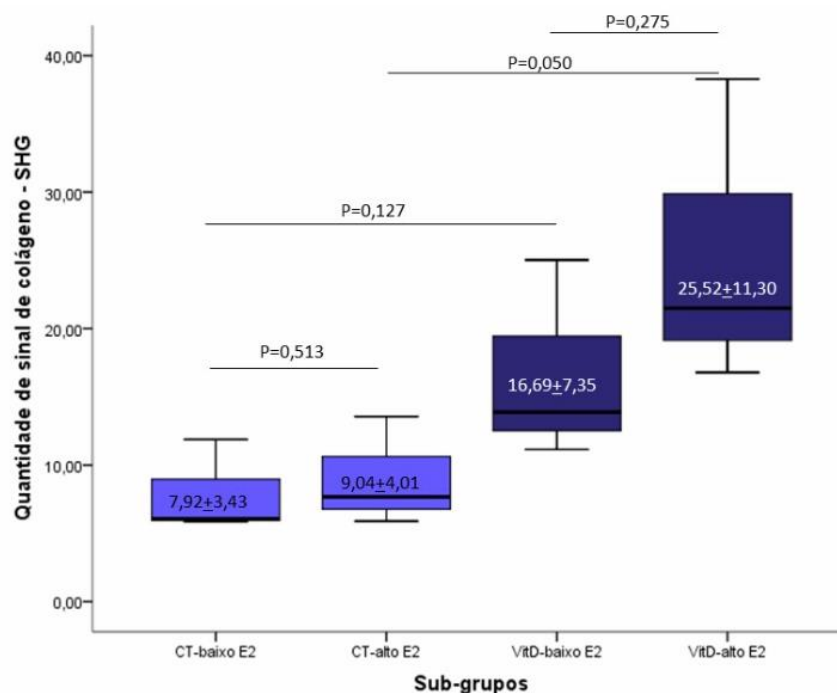
Pelo tamanho amostral reduzido, a comparação entre os grupos foi realizada utilizando o teste estatístico não paramétrico para comparação de médias Mann-Whitney. Valores de  $p < 0,05$  são considerados estatisticamente significantes.

**Tabela 14** – Descrição dos grupos de estudo em relação a quantificação de sinal de colágeno por SHG

Grupos	N	Observação
CT-baixo E2	3	1 animal (3 leituras)
CT-alto E2	3	1 animal (3 leituras)
VitD-baixo E2	3	1 animal (3 leituras)
VitD-alto E2	3	1 animal (3 leituras)

**Tabela 15** – Descrição dos grupos de estudo em relação à medida de quantidade de sinal de colágeno SHG

Sub-Grupos (epitélio SHG-normal)	N	Média	Desvio Padrão
CT-baixo E2	3	7,92	3,43
CT-alto E2	3	9,04	4,01
VitD-baixo E2	3	16,69	7,35
VitD-alto E2	3	25,52	11,30

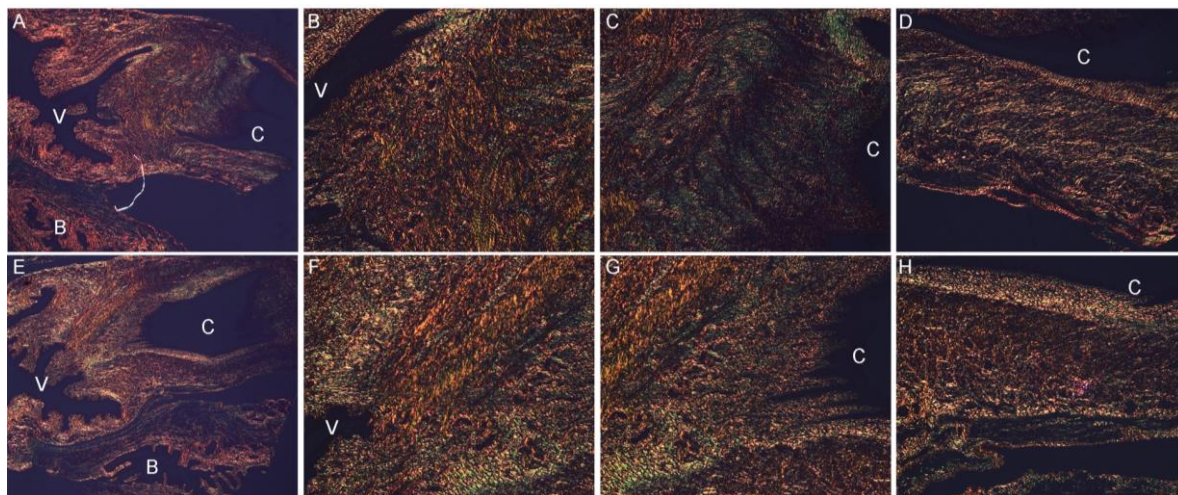


**Figura 21** – Comparação da quantidade de sinal de colágeno por SHG no epitélio vaginal das ratas, conforme ação estrogênica tecidual. Comparação da quantidade de sinal de colágeno SHG na lâmina própria do epitélio vaginal das ratas, divididas por fase de baixa ou alta ação estrogênica do ciclo estral (baixoE2 e altoE2, respectivamente), nos grupos controle (CT) e tratado com vitamina D (VIT D). Os valores apresentados referem-se à média e desvio padrão da quantidade de sinal de colágeno SHG (normal) de cada sub-grupo.

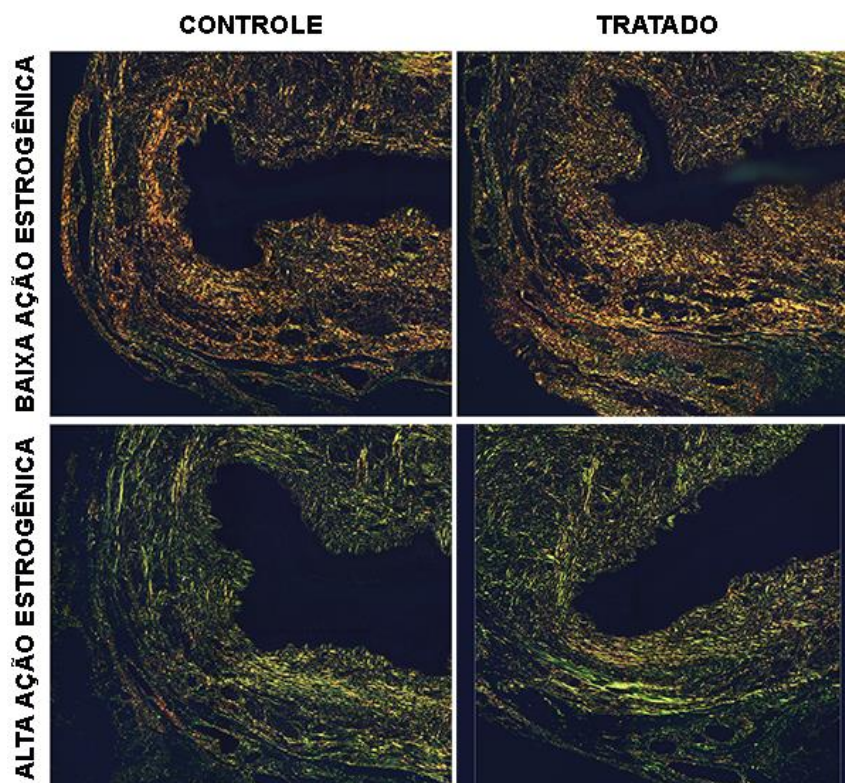
Diferenças estatisticamente significantes na quantidade de sinal de colágeno total foram encontradas apenas entre os grupos controle e tratado sob alta ação estrogênica.

#### 5.4 Picrosirius

A coloração por Picrosírius foi utilizada para comparação com a técnica de SHG em relação à quantificação de sinal de colágeno; a avaliação da estrutura tecidual foi realizada apenas com a técnica de SHG. Além disso, a técnica oferece a possibilidade de distinguir os colágenos I e III, o que pode ser notado pelas cores mais avermelhada e esverdeada, respectivamente, nas figuras 22 e 23.



**Figura 22 – Imagem por microscopia convencional, com luz polarizada sobre tecidos corados com picrosirius, cortes longitudinais.** Imagem por microscopia convencional, com luz polarizada sobre tecidos corados com picrosirius, evidenciando colágeno tipo I (vermelho) e tipo III (amarelo-esverdeado). Com um corte sagital englobando parte da vagina e do cérvix além da bexiga. A coluna da esquerda apresenta fotografias com aumento de 2,5X; nas colunas restantes temos aumento de 10X. Todas as figuras representam tecidos de ratas em diestro, estágio do ciclo em que há baixa ação estrogênica.



**Figura 23 – Imagem por microscopia convencional, com luz polarizada sobre tecidos corados com picrosirius, cortes transversais.** Imagem por microscopia convencional, com luz polarizada sobre tecidos corados com picrosirius, evidenciando colágeno tipo I (vermelho) e tipo III (amarelo-esverdeado). Com um corte axial, evidenciando coloração nitidamente mais verde nos grupos sob alta ação estrogênica.

A quantificação do colágeno a partir da técnica de Junqueira, utilizando a colocação Picrosirius, oferece a diferenciação entre os colágenos I e III. Os cortes analisados sob esta técnica possuíam  $4\mu\text{m}$  e as lâminas foram lidas sob luz polarizada no microscópio convencional Zeiss e as imagens foram capturadas com o adaptador ZEISS, câmera adapter 60N-C 2/3" 0,63x AxioCam ICc 5 e registradas com o programa AxioVision Special Edition 64 bit 4.9.1 SP1.

As lâminas foram analisadas sob microscopia de luz Axiolab Standart 2.0, acoplado a um vídeo câmera de alta resolução (AxionCam Carl Zeiss, Jena, Alemanha)<sup>®</sup> que transmite a imagem a um computador. A mesma técnica de quantificação de sinal, utilizada nas imagens adquiridas por geração de segunda harmônica, foi utilizada para as lâminas coradas por picrosirius, com auxílio do *software* ImageJ.

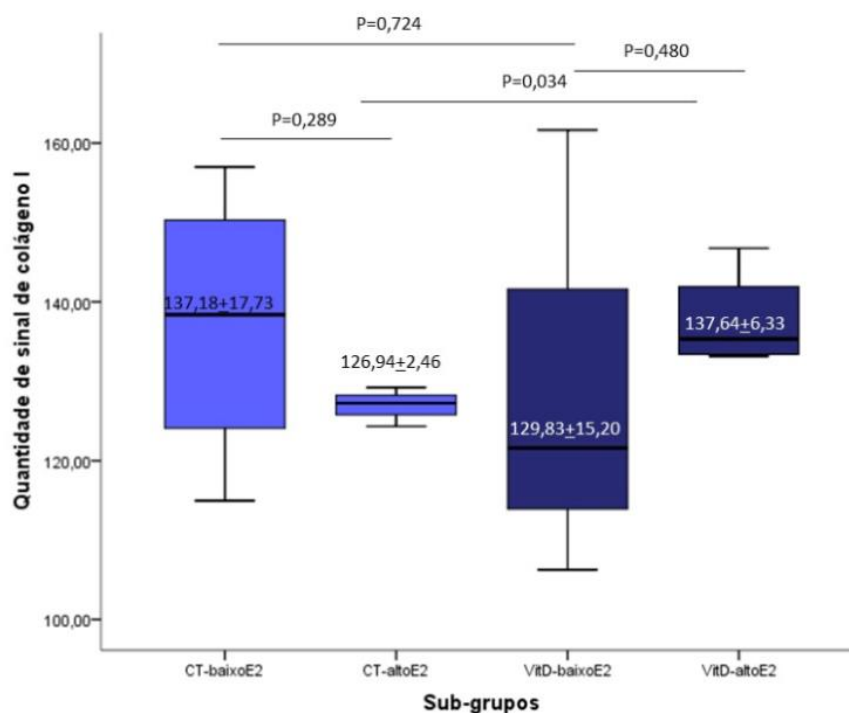
A seguir são apresentadas tabelas de descrição dos grupos, usadas para comparar as medidas de colágeno (Tabela 16) e gráficos boxplot comparativos entre os sub-grupos, em relação as medidas de colágeno I (*picro-red*) (Tabela 17 e Figura 24), colágeno III (*picro-green*) (Tabela 18 e Figura 25) e colágeno total (colágeno I + colágeno III) (Tabela 19 e Figura 26). Devido ao tamanho amostral reduzido, a comparação entre os grupos foi realizada, utilizando o teste estatístico não paramétrico para comparação de médias Mann-Whitney. Valores de  $p < 0,05$  são considerados estatisticamente significantes.

**Tabela 16** – Descrição dos grupos de estudo em relação a quantificação de sinal de colágeno por Picrosirius

Grupos	N considerado para cálculos estatísticos	Observação N (número de leituras por animal)
CT-baixo E2	4	3 animais (1 animal com duas leituras)
CT-alto E2	3	2 animais (1 animal com duas leituras)
VitD-baixo E2	3	2 animais (1 animal com duas leituras)
VitD-alto E2	4	3 animais (3 animal com duas leituras)

**Tabela 17** – Descrição dos grupos de estudo em relação a medida de quantidade de sinal de colágeno I (*picro red*)

Sub-Grupos (Colageno I)	N	Média	Desvio Padrão
CT-baixo E2	3	126,94	2,46
CT-alto E2	4	137,18	17,73
VitD-baixo E2	4	137,64	6,33
VitD-alto E2	3	129,83	28,60

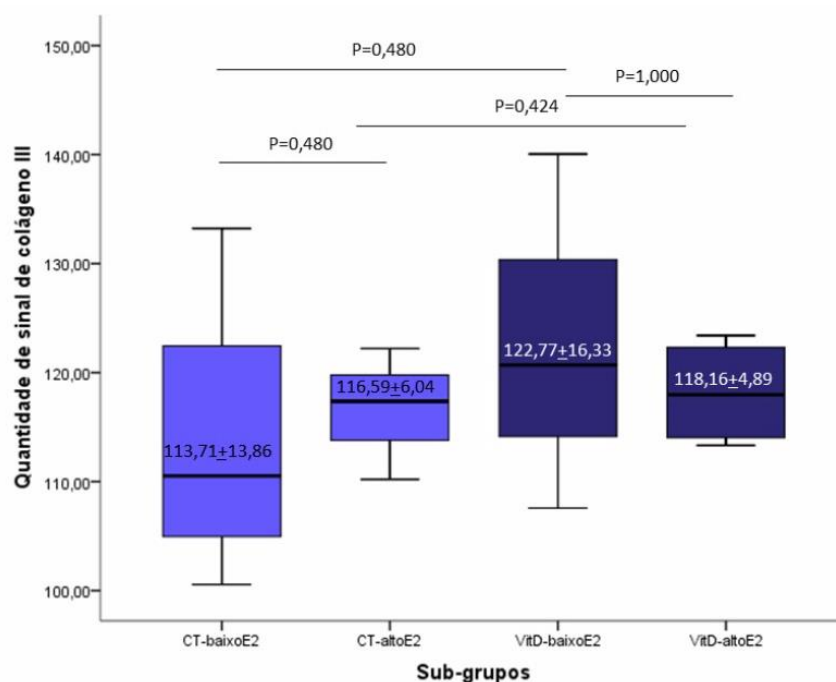


**Figura 24** – Comparação da quantidade de sinal de colágeno I por Picrosirius na lâmina própria do epitélio vaginal de ratas.

Comparação da quantidade de sinal de colágeno I (picro-red) na lâmina própria do epitélio vaginal de ratas, divididas por fase de baixa ou alta ação estrogênica do ciclo estral (baixoE2 e altoE2, respectivamente, nos grupos controle (CT) e tratados com vitamina D (VIT D). Os valores apresentados referem-se à média e desvio padrão da quantidade de sinal de colágeno I de cada sub-grupo.

**Tabela 18** – Descrição dos grupos de estudo em relação à medida de quantidade de sinal de colágeno III (*picro green*)

Sub-grupos colágeno III ( <i>picro-green</i> )	N	Média	Desvio-Padrão
CT-baixo E2	3	113,71	13,86
CT-alto E2	4	116,59	6,04
VitD-baixo E2	4	122,77	16,33
VitD-alto E2	3	118,16	4,89



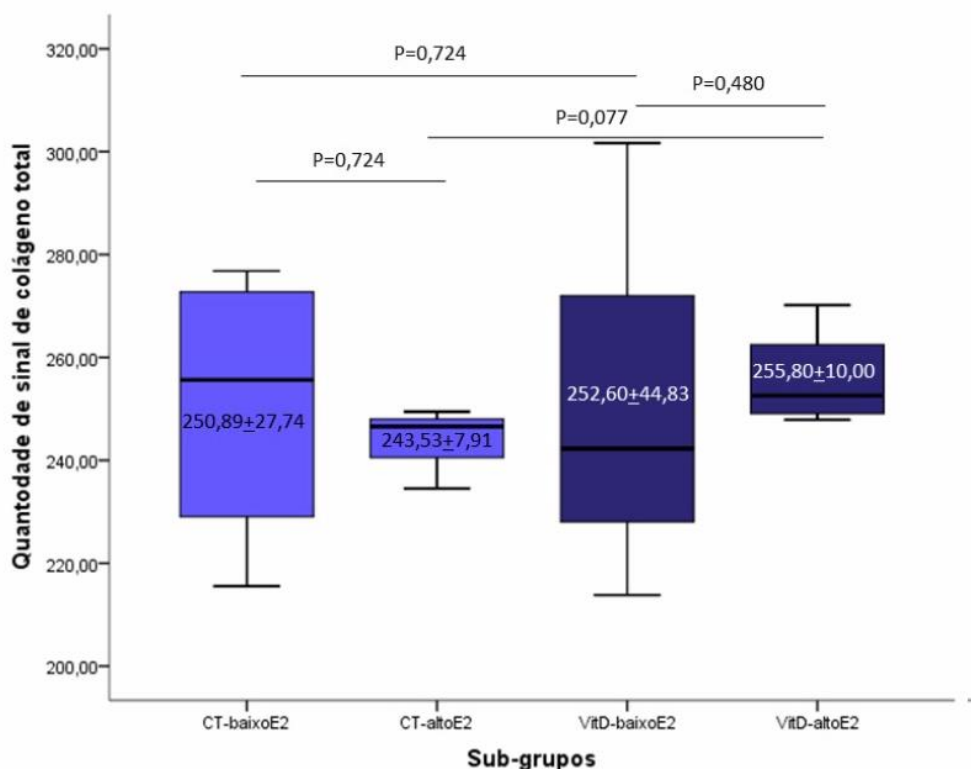
**Figura 25** – Comparação da quantidade de sinal de colágeno III por Picrosirius na lâmina própria do epitélio vaginal de ratas.

Comparação da quantidade de sinal de colágeno III (picro-green) na lâmina própria do epitélio vaginal de ratas, divididas por fase de baixa ou alta ação estrogênica do ciclo estral (baixoE2 e altoE2, respectivamente), nos grupos controle (CT) e tratados com vitamina D (VIT D). Os valores apresentados referem-se à média e desvio padrão da quantidade de sinal de colágeno III de cada sub-grupo.

**Tabela 19** – Descrição dos grupos de estudo em relação à medida de quantidade de sinal de colágeno total (colágeno I + colágeno III) pela coloração picrosirius

Sub-grupos colágeno total (colágeno I + colágeno III)	N	Média	Desvio-Padrão
CT-alto E2	3	250,89	27,74
CT-baixo E2	4	243,53	7,91
VitD-alto E2	4	252,60	44,83
VitD-baixo E2	3	255,80	10,00





**Figura 26** – Comparação da quantidade de sinal de colágeno total por Picrosirius na lâmina própria do epitélio vaginal de ratas.

Comparação da quantidade de sinal de colágeno total (colágeno I + colágeno III) na lâmina própria do epitélio vaginal de ratas, divididas por fase de baixa ou alta ação estrogênica do ciclo estral (baixoE2 e altoE2, respectivamente), nos grupos controle (CT) e tratados com vitamina D (VIT D). Os valores apresentados referem-se à média e desvio padrão da quantidade de sinal de colágeno total de cada sub-grupo.

As quantificações por picrosirius corroboram os resultados obtidos por SHG. Apesar de não evidenciar diferenças significantes, quando olhamos para o colágeno total, a diferença existe quando avaliamos, separadamente, os colágenos. Pela técnica de picrosirius, evidenciamos que a variação do colágeno vista nas imagens por SHG se deve ao colágeno tipo I.



## **5.5 Imunofluorescência**

Em todas as imagens adquiridas para a imunofluorescência, a coloração azul representa os núcleos celulares. Os componentes testados fazem parte do citoesqueleto (alfa-actina e vimentina), da superfície celular (WGA e heparam sulfato) e da MEC (fibronectina, ácido hialurônico, elastina e fibroblastos).

### **5.5.1 Citoesqueleto**

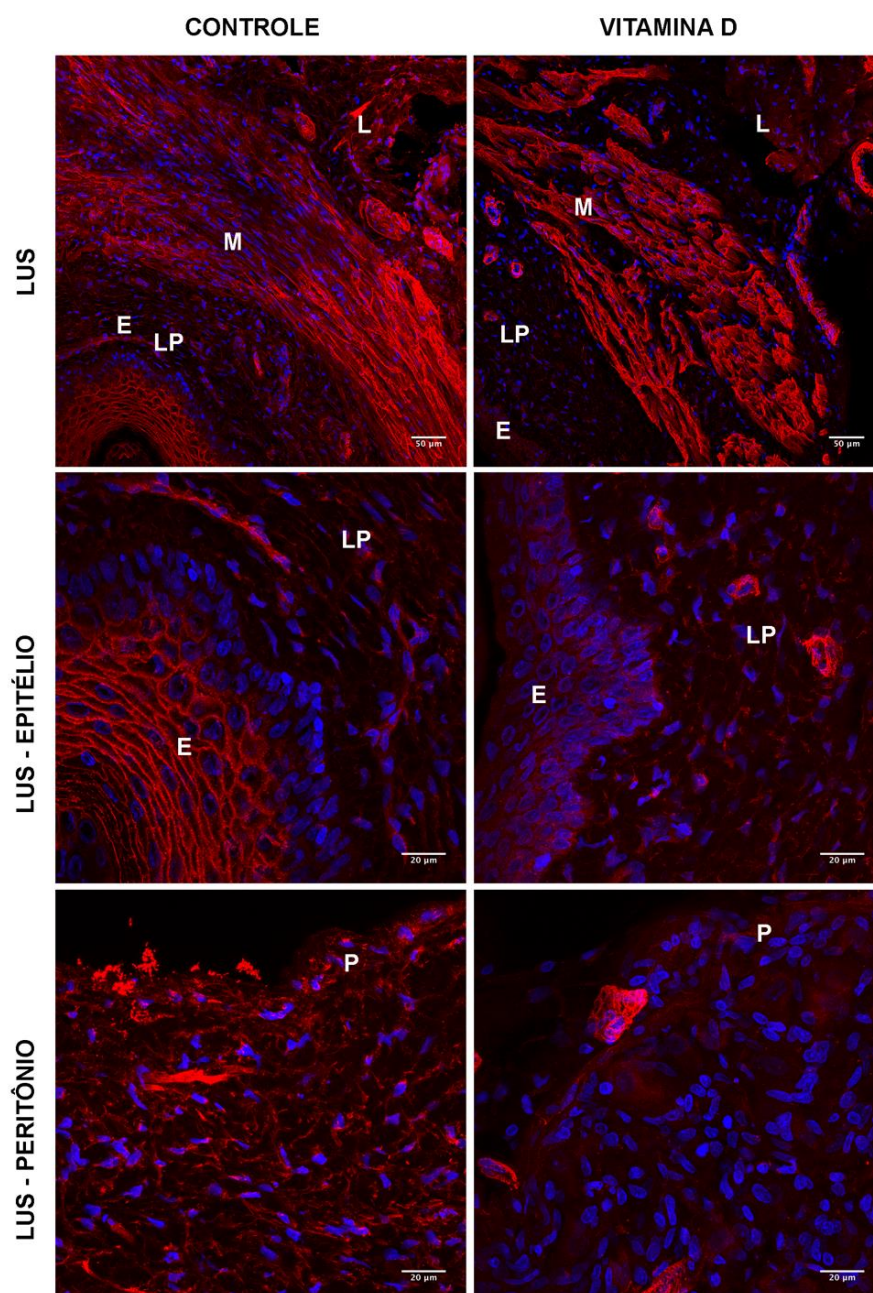
#### **Alfa-Actina**

Nas imagens geradas pela marcação de alfa-actina (Figura 27) pode-se observar diferença clara na região epitelial em que, nos controles, há marcação intensa do citoesqueleto em todo córtex celular, enquanto nos tratados a marcação é fraca e difusa no citoplasma das células epiteliais. Pode-se identificar também o que parece ser uma linha divisória aparentemente entre as camadas epitelial e lâmina própria no controle. Na região próxima ao peritônio, em detalhe (63X), observa-se maior intensidade do sinal também nos controles, já menos marcante que na região epitelial.

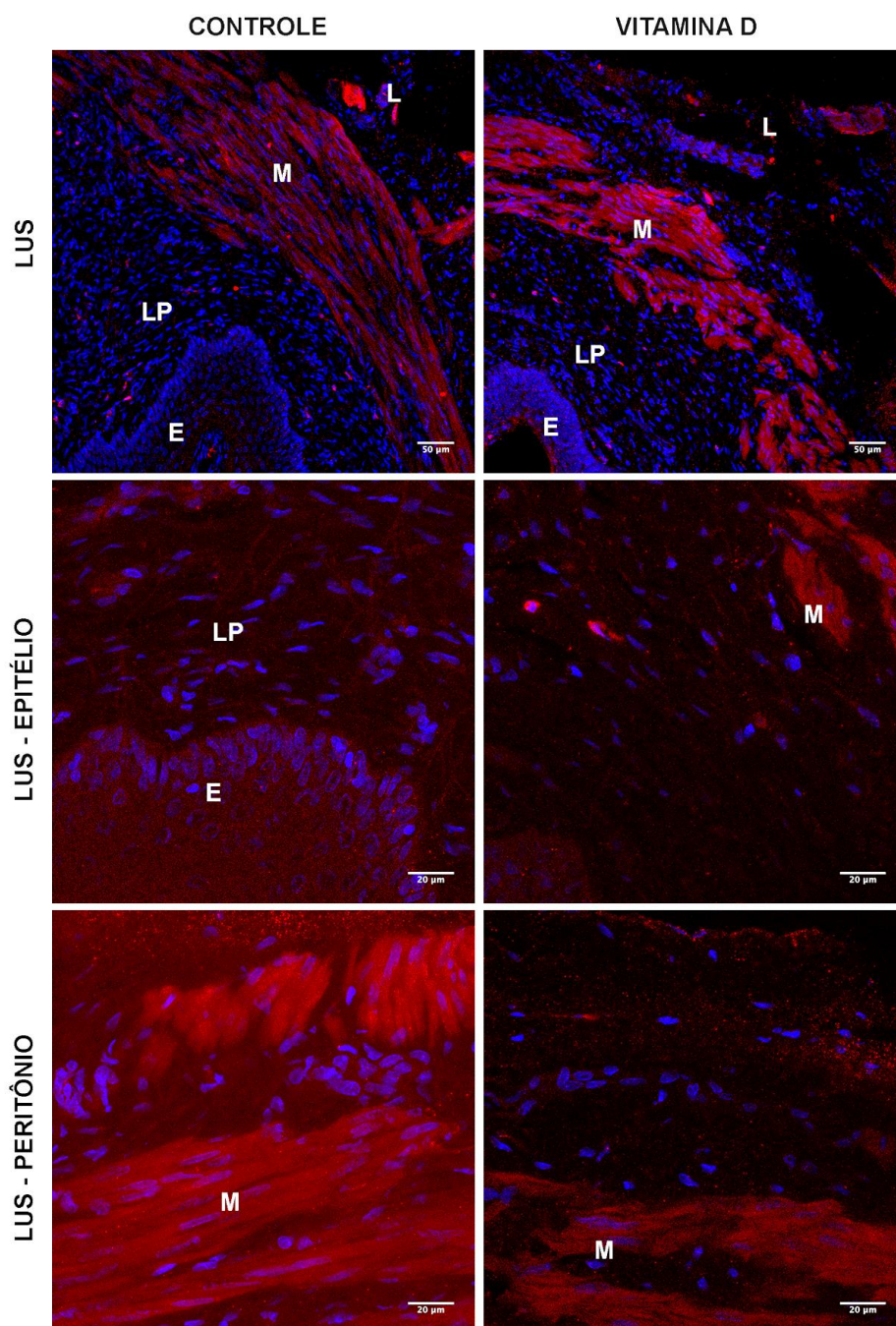
#### **Vimentina**

A marcação para vimentina foi mais evidente nas camadas musculares e, para o restante dos tecidos, não houve diferença significativa perceptível. O sinal é de tão baixa intensidade que as diferentes camadas do tecido (epitélio, muscular, lâmina própria) não são adequadamente identificadas (Figura 28).

---



**Figura 27 – Imagem de microscopia confocal de alfa-actina por marcação com anticorpos.** Imagem por microscopia confocal com imunofluorescência com marcação para  $\alpha$ -actina. Na linha superior, por objetiva de 20X, observamos a região do ligamento uterossacro em que a porção ligamentar (L), a camada muscular (M), a lâmina própria (LP) e o epitélio (E) estão representados, progressivamente, do canto superior direito ao canto inferior esquerdo da imagem. Nas linhas inferiores observamos em maior detalhe, por aumento de 63X, o epitélio e sua transição para a lâmina própria, e a região próxima do peritônio (P). Lembre-se de que as divisões exatas entre as camadas não podem ser feitas não há coloração ou técnica próprias para tal identificação nestas figuras. As imagens são representativas de ratas na mesma fase do ciclo estral, proestro, em que há alta ação estrogênica local.



**Figura 28 – Imagem de microscopia confocal de vimentina por marcação com anticorpos.** Imagem por microscopia confocal com imunofluorescência com marcação para vimentina. Na linha superior, por objetiva de 20X, observamos a região do ligamento uterossacro em que a porção ligamentar (L), a camada muscular (M), a lâmina própria (LP) e o epitélio (E) estão representados, progressivamente, do canto superior direito ao canto inferior esquerdo da imagem. Nas linhas inferiores observamos em maior detalhe, por aumento de 63X, o epitélio e sua transição para a lâmina própria, e a região próxima do peritônio (P). Lembre-se de que as divisões exatas entre as camadas não podem ser feitas, não há coloração ou técnica próprias para tal identificação nestas figuras. As imagens são representativas de ratas na mesma fase do ciclo estral, proestro, em que há alta ação estrogênica local.

### **5.5.2 Superfície Celular**

#### **Aglutinina de germen de trigo (*Wheat Germ Agglutinin – WGA*)**

O WGA interage com glicoconjugados que contém em suas estruturas na região terminal ácido siálico ou N-acetilglucosamina, destacando, portanto, a superfície celular. A marcação com WGA foi difusa nos tecidos. Para o grupo que recebeu vitamina D, não houve diferença significativa de sinal entre as diferentes regiões do tecido; já para o grupo controle há intensificação do sinal no epitélio, nas membranas celulares (Figura 29).

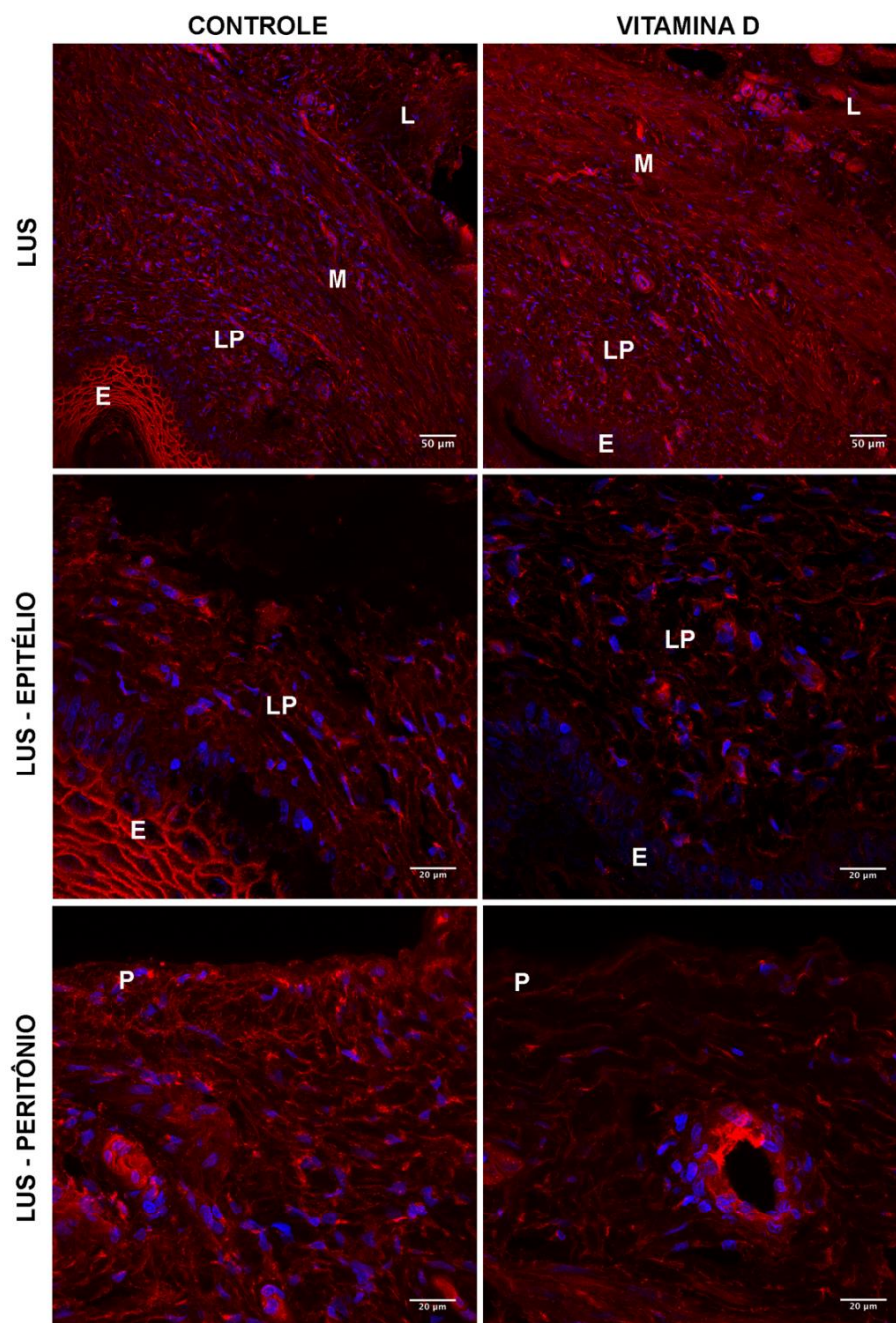
#### **Heparam Sulfato**

O heparam sulfato mostrou-se presente difusamente por todo o tecido, com maior quantidade de sinal no grupo que recebeu vitamina D. Observa-se também sinal bastante intenso, formando uma linha separando epitélio da lâmina própria em ambos os grupos, porém, especialmente, nos tratados (Figura 30).

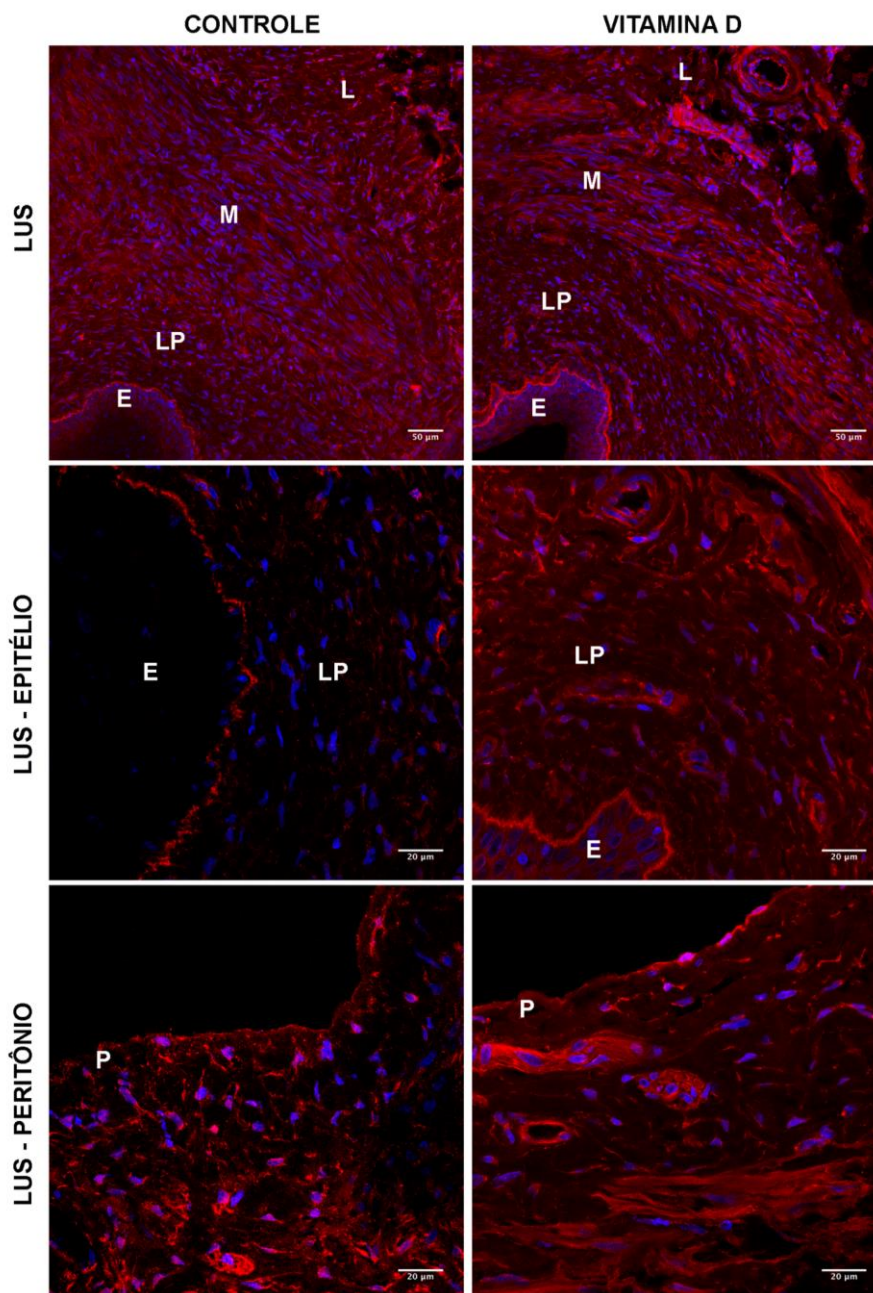
Na lâmina própria, as marcações tanto da Fibronectina como do Heparan Sulfato se mostraram difusas, porém, nos tratados com intensidade pouco maior entre as células dessas regiões, como se marcasse espaço entre as células, delimitando caminhos na conformação estrutural do tecido.

---





**Figura 29 – Imagem de microscopia confocal de *Wheat Germ Agglutinin* por marcação com anticorpos.** Imagem por microscopia confocal com imunofluorescência com marcação para WGA. Na linha superior, por objetiva de 20X, observamos a região do ligamento uterossacro em que a porção ligamentar (L), a camada muscular (M), a lâmina própria (LP) e o epitélio (E) estão representados, progressivamente, do canto superior direito ao canto inferior esquerdo da imagem. Nas linhas inferiores observamos em maior detalhe, por aumento de 63X, o epitélio e sua transição para a lâmina própria, e a região próxima do peritônio (P). Lembre-se de que as divisões exatas entre as camadas não podem ser feitas, não há coloração ou técnica próprias para tal identificação nestas figuras. As imagens são representativas de ratas na mesma fase do ciclo estral, proestro, em que há alta ação estrogênica local.



**Figura 30 – Imagem de microscopia confocal de heparam sulfato por marcação com anticorpos.** Imagem por microscopia confocal com imunofluorescência com marcação para heparam sulfato. Na linha superior, por objetiva de 20X, observamos a região do ligamento uterossacro em que a porção ligamentar (L), a camada muscular (M), a lâmina própria (LP) e o epitélio (E) estão representados, progressivamente, do canto superior direito ao canto inferior esquerdo da imagem. Nas linhas inferiores observamos em maior detalhe, por aumento de 63X, o epitélio e sua transição para a lâmina própria, e a região próxima do peritônio (P). Lembre-se de que as divisões exatas entre as camadas não podem ser feitas, não há coloração ou técnica próprias para tal identificação nestas figuras. As imagens são representativas de ratas na mesma fase do ciclo estral, proestro, em que há alta ação estrogênia local.

### **5.5.3 Matriz Extracelular**

#### **Fibronectina**

Mantendo os padrões observados com a  $\alpha$ -actina, vemos maior sinal nas camadas musculares e no endotélio. A fibronectina mostrou-se difusamente presente na MEC em toda espessura do corte dos grupos tratado e controle, sem que grandes diferenças possam ser observadas nas regiões do epitélio, lâmina própria e peritônio (Figura 31).

#### **Ácido Hialurônico**

O ácido hialurônico mostrou-se difusamente presente em todo o tecido com sinal discretamente maior na região epitelial. A marcação foi mais evidente em todas as regiões nos tecidos do grupo que recebeu vitamina D (Figura 32).

#### **Elastina**

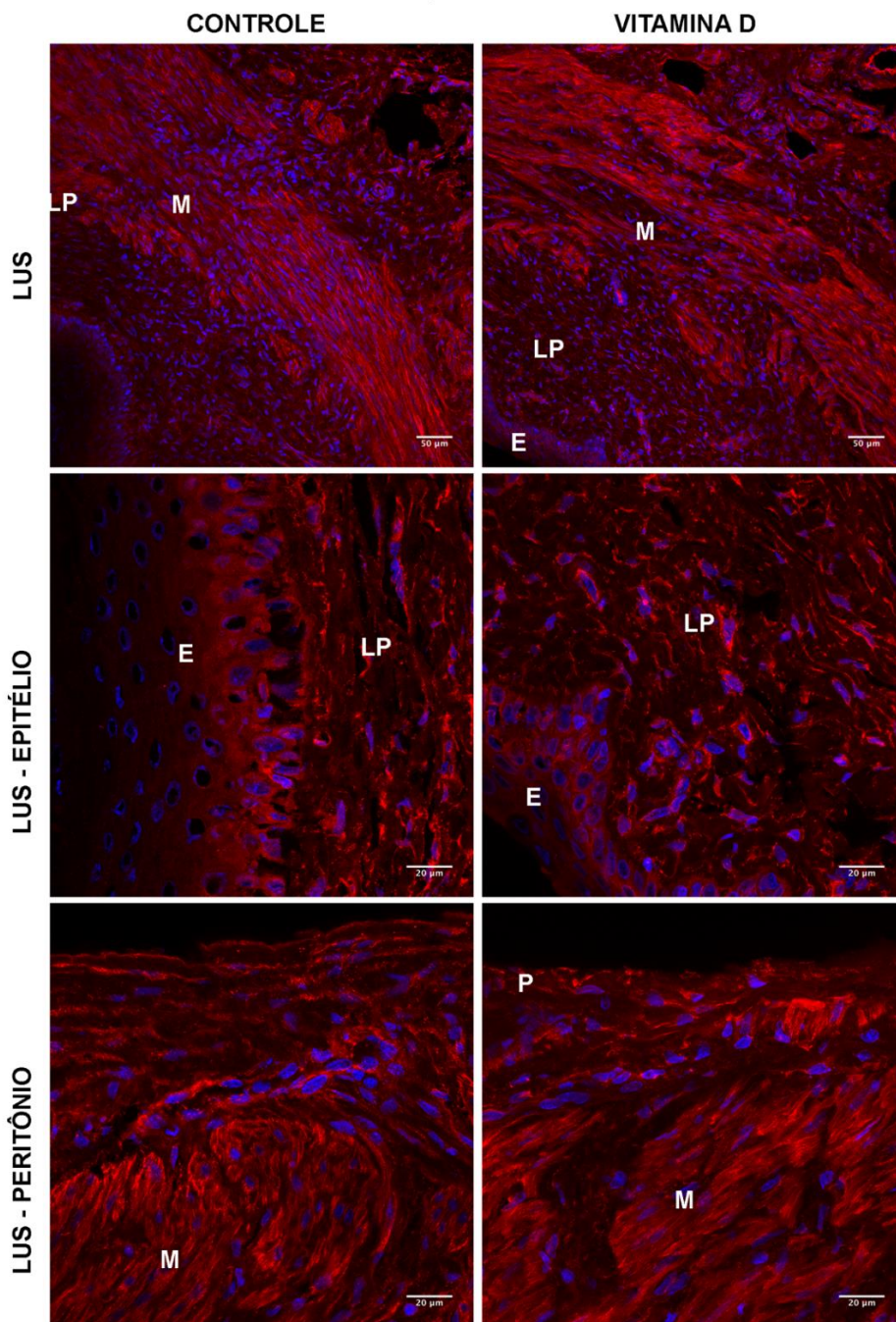
A elastina, importante componente estrutural da MEC, foi avaliada por microscopia confocal por autofluorescência (Figura 33). A elastina é um fluoróforo endógeno capaz de emitir luz sob a influência de um laser que excita as suas moléculas, não sendo necessária marcação com anticorpo primário para captação e visualização dos sinais por ela gerados. As diferenças em relação à disposição da elastina não se fazem óbvias, exceto pela visualização das fibras em maior extensão nos controles, o que pode ser causado por pequena obliquidade nos cortes.

#### **Fibroblasto**

Diferente das marcações anteriores,  $\alpha$ -actina e fibronectina, a marcação para fibroblastos apresentou maior sinal na região epitelial. A marcação não evidencia grandes diferenças entre os tecidos dos grupos tratados e controles (Figura 34).

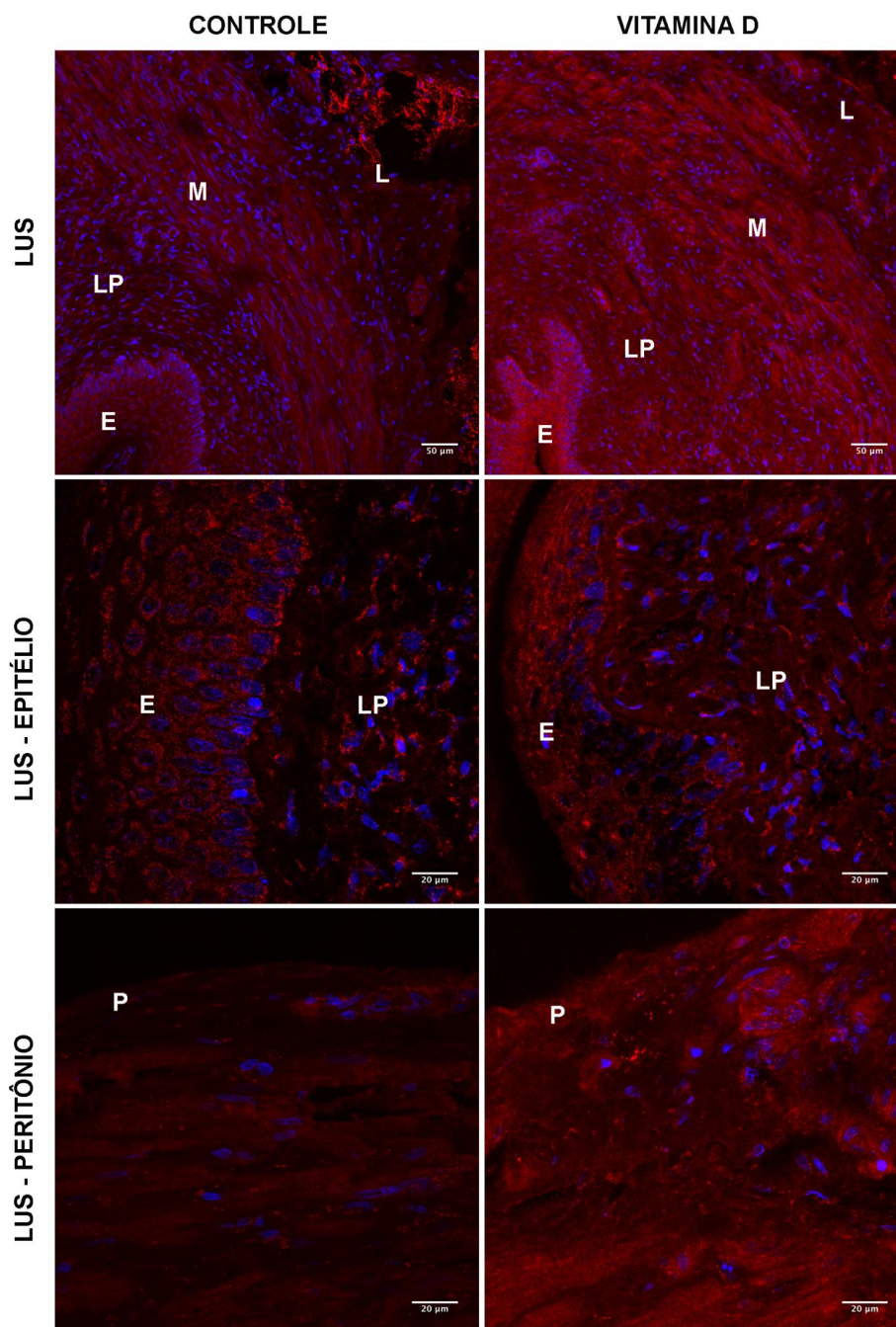
---



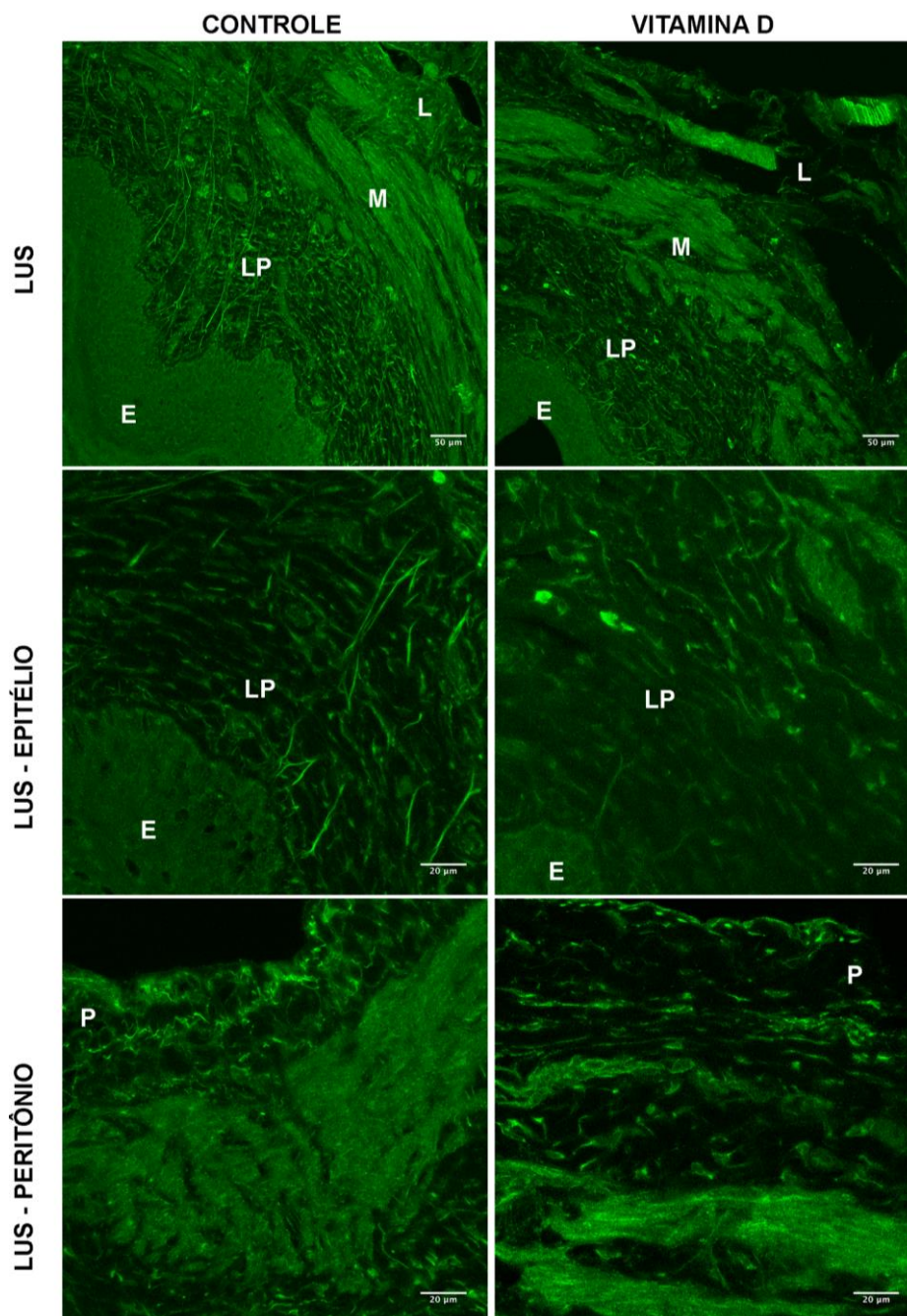


**Figura 31 – Imagem de microscopia confocal de fibronectina por marcação com anticorpos.** Imagem por microscopia confocal com imunofluorescência com marcação para fibronectina. Na linha superior, por objetiva de 20X, observamos a região do ligamento uterossacro em que a porção ligamentar (L), a camada muscular (M), a lâmina própria (LP) e o epitélio (E) estão representados, progressivamente, do canto superior direito ao canto inferior esquerdo da imagem. Nas linhas inferiores observamos em maior detalhe, por aumento de 63X, o epitélio e sua transição para a lâmina própria, e a região próxima do peritônio (P). Lembre-se de que as divisões exatas entre as camadas não podem ser feitas, não há coloração ou técnica próprias para tal identificação nestas figuras. As imagens são representativas de ratas na mesma fase do ciclo estral, proestro, em que há alta ação estrogênica local.



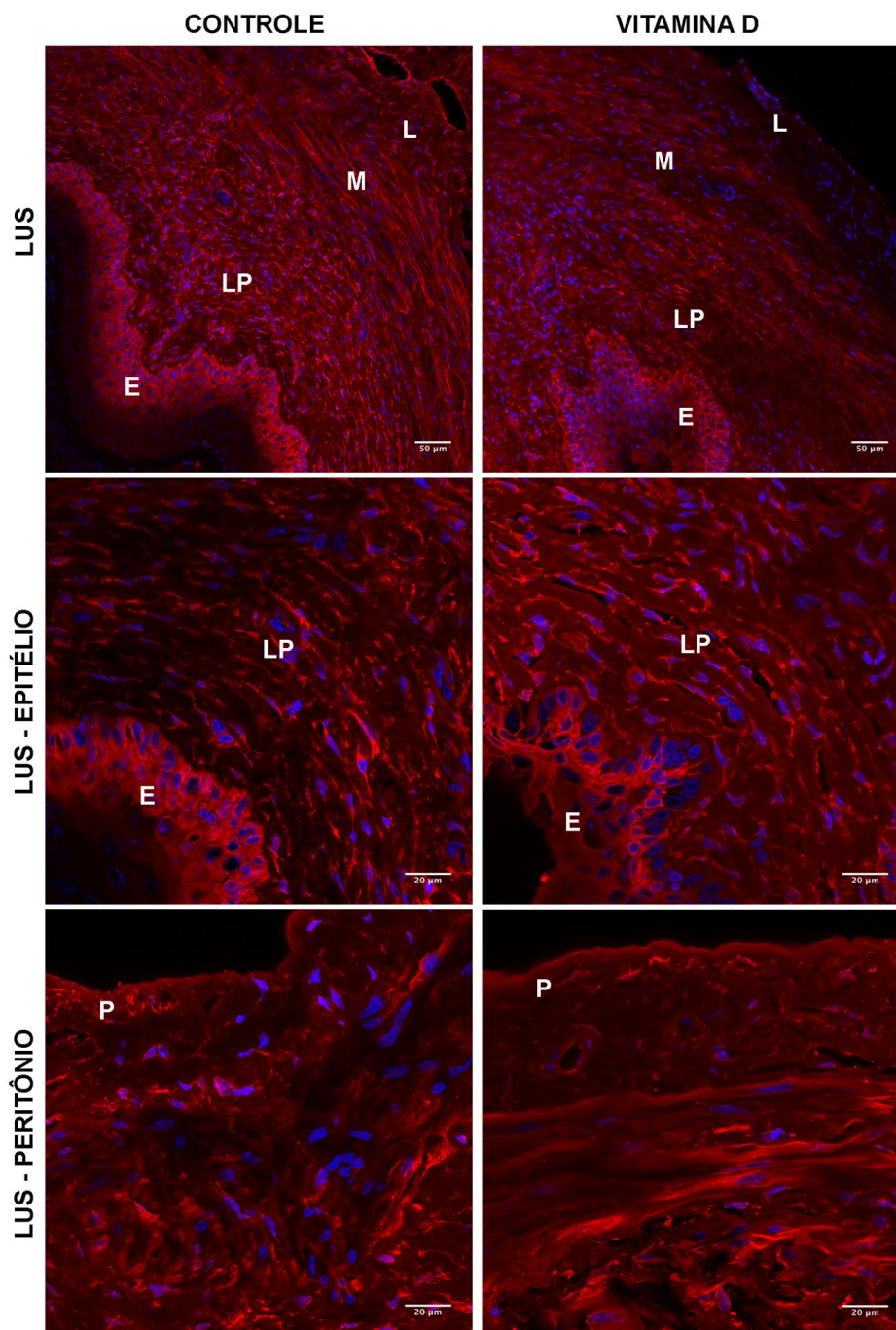


**Figura 32 – Imagem de microscopia confocal de ácido hialurônico por marcação com proteína de ligação.** Imagem por microscopia confocal com imunofluorescência com marcação para ácido hialurônico. Na linha superior, por objetiva de 20X, observamos a região do ligamento uterossacro em que a porção ligamentar (L), a camada muscular (M), a lâmina própria (LP) e o epitélio (E) estão representados, progressivamente, do canto superior direito ao canto inferior esquerdo da imagem. Nas linhas inferiores observamos em maior detalhe, por aumento de 63X, o epitélio e sua transição para a lâmina própria, e a região próxima do peritônio (P). Lembre-se de que as divisões exatas entre as camadas não podem ser feitas, não há coloração ou técnica próprias para tal identificação nestas figuras. As imagens são representativas de ratas na mesma fase do ciclo estral, proestro, em que há alta ação estrogênica local.



**Figura 33 – Imagem de microscopia confocal de elastina por autofluorescência.** Visualiza-se fibras de elastina. Na linha superior, por objetiva de 20X, observamos a região do ligamento uterossacro em que a porção ligamentar (L), a camada muscular (M), a lâmina própria (LP) e o epitélio (E) estão representados, progressivamente, do canto superior direito ao canto inferior esquerdo da imagem. Nas linhas inferiores observamos em maior detalhe, por aumento de 63X, o epitélio e sua transição para a lâmina própria, e a região próxima do peritônio (P). Lembre-se de que as divisões exatas entre as camadas não podem ser feitas não há coloração ou técnica próprias para tal identificação nestas figuras. As imagens são representativas de ratas na mesma fase do ciclo estral, proestro, em que há alta ação estrogênica local.





**Figura 34 – Imagem de microscopia confocal de fibroblasto por marcação com anticorpos.** Imagem por microscopia confocal com imunofluorescência com marcação para fibroblasto. Na linha superior, por objetiva de 20X, observamos a região do ligamento uterossacro em que a porção ligamentar (L), a camada muscular (M), a lâmina própria (LP) e o epitélio (E) estão representados, progressivamente, do canto superior direito ao canto inferior esquerdo da imagem. Nas linhas inferiores observamos em maior detalhe, por aumento de 63X, o epitélio e sua transição para a lâmina própria, e a região próxima do peritônio (P). Lembre-se de que as divisões exatas entre as camadas não podem ser feitas, não há coloração ou técnica próprias para tal identificação nestas figuras. As imagens são representativas de ratas na mesma fase do ciclo estral, proestro, em que há alta ação estrogênia local.

#### **5.5.4 Regiões ligamentares propriamente ditas**

De maneira geral, as imagens de imunohistoquímica do LUS não evidenciaram grandes diferenças visualmente notáveis (Figuras 35 e 36). A vimentina não evidenciou marcação e por isso não foi incluída nas imagens.

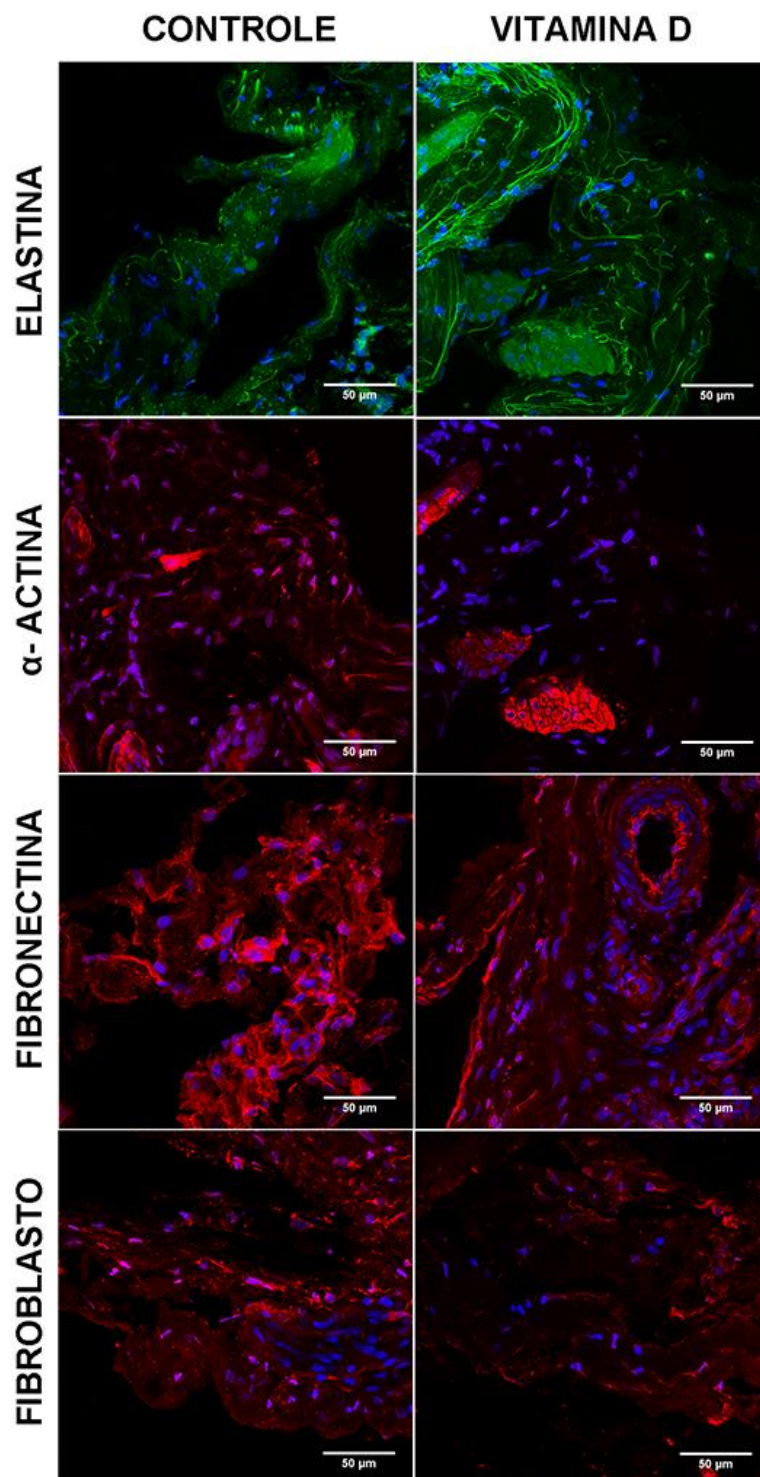
O sinal para elastina parece ser mais intenso no grupo tratado com vitamina D. Como essa região é extremamente maleável, pode sofrer interferências para interpretação pela obliquidade dos cortes (Figura 35).

O padrão mais definido e intenso nos controles, como nas imagens anteriores para alfa-actina, se mantém nas imagens dos ligamentos; nos tratados podemos ver marcação intensa nos agrupamentos de células nervosas, porém, como essas imagens não eram de interesse da pesquisa e semelhantes não foram adquiridas no grupo controle, não há possibilidade de comparação (Figura 35).

A fibronectina mostrou-se difusamente presente na MEC em toda espessura do corte dos grupos tratado e controle, sem que grandes diferenças possam ser observadas também na região ligamentar.

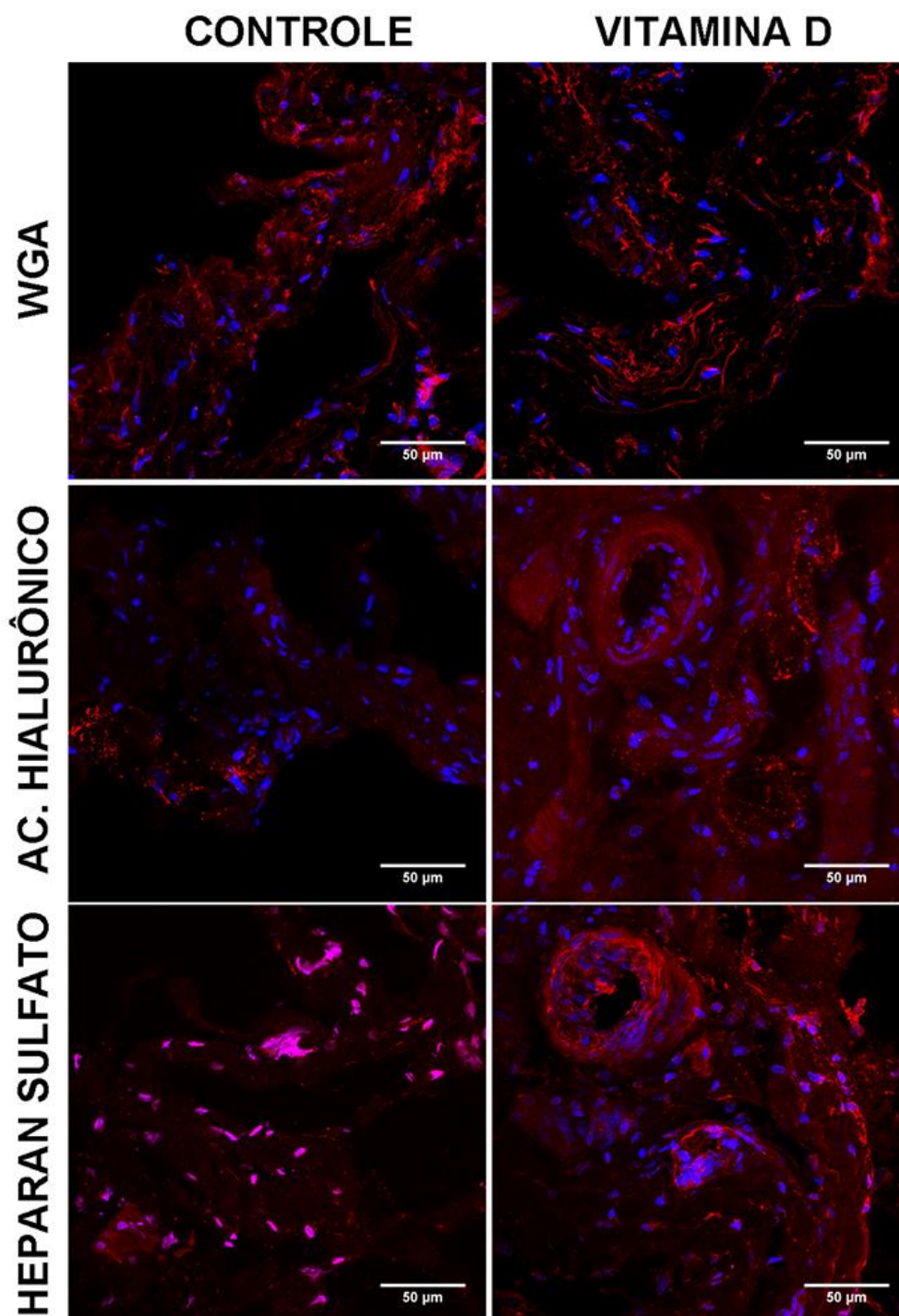
As marcações para fibroblasto (Figura 35), WGA, ácido hialurônico e heparam sulfato (Figura 36) também não apresentaram diferenças claras.

---



**Figura 35 – Imagem de microscopia confocal do ligamento uterossacro.** Estão marcados os componentes da MEC elastina, alfa-actina, fibronectina e fibroblasto, por marcação com anticorpos. Imagem por microscopia confocal com imunofluorescência do ligamento uterossacro do grupo controle, coluna da esquerda, e tratado, coluna da direita; elastina, alfa-actina, fibronectina e fibroblasto foram marcados.





**Figura 36 – Imagem de microscopia confocal,do ligamento uterossacro.** Estão marcados os componentes da MEC ácido hialurônico e heparan sulfato, por marcação com anticorpos, e glicoconjugados contendo ácido siálico e N-acetilglucosamina por WGA. Imagem por microscopia confocal com imunofluorescência do ligamento uterossacro do grupo controle, painel da esquerda, e tratado, painel da direita; ácido hialurônico e heparan sulfato foram marcados por anticorpos específicos e glicoconjugados por WGA..



Trevor Marshall, grande estudioso da vitamina D e suas ações, fez uma declaração importante: “a biologia molecular rapidamente está compreendendo os múltiplos papéis do VDR, mas a medicina clínica está tendo dificuldades para acompanhar a velocidade das mudanças”<sup>(47)</sup>. Essa afirmação se refere à maneira simplista com que muitos têm pesquisado e feito conclusões a respeito do colecalciferol. Há dois conceitos que devem estar bastante claros, antes de se analisar quaisquer estudos relacionados à vitamina D: nomenclatura e funções do VDR.

A primeira confusão acontece com os nomes que se atribuem a todos os metabólitos e precursores da vitamina D. Assim, são necessários os seguintes conceitos definidos para uma discussão clara: colecalciferol ou vitamina D é a substância produzida na epiderme; calcidiol ou 25(OH)D é o parâmetro laboratorial mais aceito para avaliar o *status* da vitamina D sérica e calcitriol ou 1,25(OH)<sub>2</sub>D é o metabólito ativo. A segunda confusão acontece por conta do conceito por trás do nome consagrado, já que a vitamina é de fato um hormônio e, agindo por meio de seu receptor nuclear, VDR, não pode ser alvo de raciocínio tão simplista induzido pela denominação que mantemos por hábito, ou seja, a dosagem sérica da 25(OH)D não é um reflexo direto e linear da sua atividade nos tecidos.

Nesta pesquisa, conforme protocolo realizado anteriormente, os animais receberam uma dose oral de colecalciferol, aproximadamente, 50 vezes maior que a dose habitual adquirida através da alimentação, por 18 dias; em um humano, isso representaria 1500Ui por Kg por dia, ou seja, 105 mil unidades por dia em um adulto de 70Kg. Era esperado que os animais tivessem, no momento da eutanásia, colecalciferol plasmático pelo menos 10 vezes acima do normal, calcidiol sérico, aproximadamente, cinco vezes acima do normal e colecalciferol na gordura subcutânea, aproximadamente, sete vezes acima do habitual.<sup>(69)</sup> Assim, não sabemos o depósito esperado dessas substâncias na fáscia endopélvica, que não foi avaliada em pesquisas prévias, mas espera-se que os valores estejam também superiores ao habitual. Cálcio e potássio também foram avaliados em outro estudo com valores aumentados em certos tecidos como sangue, rins, duodeno e músculo cardíaco, porém, sem variação do conteúdo de cálcio no cérebro, músculo esquelético e fígado<sup>(70)</sup>, portanto, não há dados sobre os valores esperados para esses íons no tecido em questão.

---



Não podemos inferir que as ações do calcitriol sobre o VDR tenham sido aumentadas ou reduzidas nesta pesquisa. Em se tratando de um hormônio com diversos *feedbacks* positivos e negativos, em um animal saudável, uma das possibilidades é a de que tenhamos realizado uma inibição da atividade da  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  sobre o VDR pela hiperdose do seu precursor. Assim, durante toda a discussão, falaremos sobre o efeito da hiperdose oral de vitamina D e não sobre efeitos consequentes da ativação do VDR.

Apesar da associação entre administração de vitamina D oral em humanos e redução do peso e IMC<sup>(151)</sup>, não tivemos variação significativa dos pesos das ratas do grupo controle, comparado ao grupo que recebeu vitamina D. O tempo reduzido do estudo pode ser um fator restritivo para avaliação de possíveis alterações em relação ao ganho de peso dos animais.

A espessura do epitélio vaginal das ratas também foi analisada e, determinadas as influências hormonais sobre o epitélio, dividimos cada grupo (controle e tratado) em dois subgrupos: baixa atividade estrogênica e alta atividade estrogênica, conforme a fase do ciclo estral. O epitélio vaginal de ratas apresenta receptor para  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ , metabólito ativo capaz de induzir a proliferação epitelial neste tecido. Além disso, a menor presença do estrogênio está associada à menor quantidade de receptores no epitélio em questão e o próprio metabólito é capaz de exercer *up-regulation* para o seu receptor.<sup>(101,103)</sup>

Houve diferença estatística na espessura do epitélio entre as diferentes fases do ciclo estral tanto no grupo controle, quanto no grupo tratado com vitamina D. Não houve diferença significativa entre os grupos controle e tratado, quando sob baixa ação estrogênica ou quando sob alta ação estrogênica, porém, a diferença entre os grupos tratado e controle atingiram um *p* de 0,52, quando sob baixa ação estrogênica. Uma das possíveis explicações para a ausência de significância estatística seria o pequeno valor amostral.

Na análise da organização das fibras colágenas, por se tratar de uma análise tecidual puramente descritiva, a maior dificuldade se deu pela falta de padronização de método existente na literatura tanto em humanos, quanto no modelo animal. A proximidade à parede pélvica ou à cérvix pode trazer diferenças que impossibilitam

---

a comparação dos resultados.<sup>(89)</sup> Como a maioria dos estudos observa as diferenças nas regiões da parede vaginal anterior, especialmente porções média e apical<sup>(137,139,141,142,152,153)</sup>, optamos por avaliar, além do ligamento uterossacro, também o tecido conjuntivo da região apical da vagina.

Pouca quantidade de amostra tecidual foi perdida no processo de padronização dos cortes pela dificuldade inicial de lidar com o criostato e de identificar a altura ideal do corte, que não existe na literatura. Neste processo, concluímos que o corte transversal oferece referências suficientes para localização espacial das regiões do tecido e que deveriam estar presentes, para a identificação da altura do corte, à luz do colo uterino (dupla) e à luz da vagina com os fôrnices próximos da parede posterior. Assim, asseguramos a presença da região do ístmo com a porção representativa da inserção do ligamento uterossacro em todas as amostras utilizadas.

Comparamos imagens com cortes de 4, 30 e 50 micrômetros. Nos cortes de menor espessura, as fotografias obtidas por SHG são bastante semelhantes sem diferenças visuais óbvias quanto à organização das fibras, que parecem todas onduladas e de espessura pouco variável. Nos cortes mais espessos é possível notar com maior facilidade a diferença de disposição e aspecto. Assim, sugerimos que a análise arquitetural dos **componentes** fibrosos da MEC por SHG é melhor avaliada a partir de cortes espessos, para os quais a microscopia de luz convencional, com colorações como HE e picrosirius ou mesmo por imunofluorescência, não se mostram adequadas.

A análise dos cortes de 30 micrômetros evidenciou, de modo geral, na camada muscular, fibras mais compactas, como descrito por Badiou<sup>(141)</sup> e Boreham<sup>(142)</sup>, alinhadas em uma direção preferencial, quando comparadas às outras camadas. A camada epitelial não apresenta fibras colágenas e mostrou-se, portanto, sempre com ausência de sinal. Na lâmina própria e adventícia as fibras aparentavam estar mais “soltas”, com mais espaço entre elas, aspecto mais “enrugado”, como observado no subepitélio vaginal por Sridharan<sup>(137)</sup>, comparado à muscular, e mantendo o aspecto de tecido de cestaria, conforme descrito no tecido conjuntivo da subderme na pele.<sup>(154)</sup> Quanto mais afastadas do epitélio, as fibras adquiriam aspecto em malha, como conexões transversais, unindo o

---

estroma ao peritônio nas regiões retrouterina e do ligamento uterossacro, nesta região, ainda mais soltas, desorganizadas e sem uma direção preferencial. Comparando os grupos, os animais tratados apresentavam característica mais “enrugada” e mais densa das fibras, não necessariamente compactas.

No grupo controle, os tecidos sob maior influência estrogênica apresentaram menos espaços vazios entre as fibras de colágeno e mais ramificações quanto mais afastadas do epitélio; na lâmina própria há mais imagens granulares e, na camada muscular, as fibras têm aspecto mais retilíneo, organizadas bem próximas umas das outras seguindo uma mesma direção, especialmente na porção retrouterina. Na região ligamentar propriamente dita, o colágeno se mostra com organização aleatória em todos os grupos.

No grupo tratado, as imagens são mais semelhantes entre si; não há tanto espaço entre as fibras nos tecidos com alta e com baixa influência estrogênica. O tecido sob alta ação estrogênica também evidencia mais ramificações nas regiões mais centrífugas, oferecendo a impressão de maior integridade do tecido. Sob baixa ação estrogênica não há organização tão marcante da camada muscular, em relação às outras camadas. Testes biomecânicos serão essenciais para as próximas pesquisas em que se objetiva esclarecer o significado clínico das diferenças estruturais da MEC.

Sobre a quantificação do colágeno total por SHG, houve diferença estatística entre os grupos sob alta ação estrogênica (controle e tratado), com maior quantidade de sinal na amostra que recebeu vitamina D. Esse padrão se repetiu na técnica de picrosírio para o colágeno tipo I, sem diferença estatística para o colágeno tipo III. Sabemos que o estrogênio apresenta influência importante nos tecidos, incluindo o epitélio vaginal, com diminuição do conteúdo de colágeno subepitelial, nesta região, na ausência do hormônio, em humanos.<sup>(135,137)</sup> A quantidade de colágeno no tecido da fáscia endopélvica em ratos sob ingesta de diferentes quantidades de vitamina D não foi avaliada na literatura; o tecido mais aproximado da fáscia endopélvica, no sentido estrutural, para o qual os estudos citam as ações da vitamina ou de seus metabólitos é a derme, ainda assim, sob situações especiais como cicatrização e câncer.

---

O fato de haver diferença quantitativa significativa de colágeno entre os ratos tratados e não tratados, apenas o grupo sob alta influência estrogênica demonstra a interação entre os dois hormônios. Já a diferença qualitativa estrutural das fibras de colágeno nos ratos do grupo controle e tratado sob ação estrogênica reduzida, demonstra que há alterações desencadeadas pela ingesta oral de vitamina D, suficientes para alterar a arquitetura da MEC, mesmo na ausência de interação com o estrogênio.

Não pudemos utilizar os tecidos corados por picrosirius para comparação, pois os cortes pertenciam a amostras de ratas diferentes e não geraram imagens idênticas ou quase idênticas; utilizamos esta coloração para quantificação de sinal apenas. Na tentativa de esclarecer as diferenças entre os sinais captados no detector anterior (F-SHG) e posterior (EPI-SHG) no método SHG, fizemos uma imagem em SHG da cauda de um dos animais, onde há apenas colágeno tipo I. Obtivemos quase que absolutamente apenas sinais captados no detector anterior e ínfima quantidade de sinal na detecção posterior, neste caso, apenas com aumento excessivo do ganho, o que provavelmente se deve a ruído e não captação de sinal propriamente dita.

Realizamos, então, a marcação de outro corte da mesma amostra com anticorpos para colágenos tipo I e tipo III, e obtivemos sinal apenas para colágeno tipo I. O experimento confirma que há captação de sinal de colágeno tipo I pelo método de geração de segunda harmônica. Assim, mantemos o questionamento, conforme descrito anteriormente<sup>(150)</sup>, se os sinais captados nos detectores anterior (F-SHG) e posterior (EPI-SHG) podem representar diferentes tipos de colágeno (I e III), o que necessitaria de novos testes com marcações com anticorpos específicos em outros tecidos para comprovação.

Não era objetivo principal, deste estudo, porém, por disponibilidade do material, também fizemos marcação dos tecidos para outros produtos do citoesqueleto e estruturais da matriz extracelular. Estes não puderam ser realizados em triplicata, ou seja, apenas um animal do grupo controle e um animal do grupo tratado foram testados, ambos sob alta ação estrogênica. Os resultados foram bastante diferentes para as imagens de alfa-actina, heparam sulfato e glicoconjugados detectados pela WGA.

---

As marcações para alfa-actina e com WGA foram semelhantes, bastante exuberantes no córtex celular e na membrana celular, dos animais controle e sem marcação expressiva nos tratados. Os marcadores representam substâncias com funções estruturais e de comunicação e de adesão celular. O heparam sulfato apresentou marcação intensa em fina lâmina, com pontos de descontinuidade entre o epitélio e a lâmina própria nos controles e em lâmina contínua nos tratados. Mais uma vez não se pode inferir a consequência clínica das diferenças nas marcações. Porém, os achados levantam novos questionamentos sobre quais seriam as possíveis consequências, quanto à adesividade entre as células ou entre as camadas histológicas e, portanto, se haveria alguma interferência na integridade e/ou resistência dessa fáscia quando sob influência da vitamina D, se submetida à estresse biomecânico.

Sabemos que o estrogênio estimula a expressão da heparanase (estudo realizado no endométrio humano)<sup>(155)</sup> e dos receptores para vitamina D; também sabemos que a vitamina D inibe a expressão da heparanase, permitindo a presença de maior quantidade de heparam sulfato no tecido (estudo realizado no tecido renal de ratos).<sup>(156)</sup> Supondo que ambas as condições se mantenham na fáscia endopélvica e no epitélio vaginal, poderíamos explicar a intensidade de sinal diferente do heparam sulfato apenas nos grupos sob alta ação estrogênica. Assim, considerando que os tecidos tratados teriam maior quantidade de heparam sulfato, podemos fazer a hipótese de que esses tecidos teriam maior adesão entre as células.

Pela autofluorescência, não houve variação óbvia de quantidade de sinal para a elastina entre os grupos tratado e controle; estruturalmente, no entanto, as fibras parecem mais curtas entre o epitélio e peritônio, mas parecem mais longas, acompanhando as curvas do ligamento, no ligamento uterossacro. Esta diferença estrutural pode ocorrer por diferentes obliquidades no corte, viés que tentamos corrigir com os tecidos mais espessos.

Com certeza, para identificar as implicações clínicas da interferência da vitamina D no tecido conjuntivo da pelve, testes biomecânicos devem ser utilizados. A vitamina D sérica em maior quantidade poderia estimular o fibroblasto por ação

---

direta e, em última instância, promover diferenças na matriz extracelular; as alterações indiretas da vitamina sobre os tecidos, possivelmente promovem a disposição e conformação alterada das fibras. Essas hipóteses não foram esclarecidas nesta pesquisa, porém a constatação da alteração estrutural da matriz extracelular da fáscia responsável pela sustentação dos órgãos pélvicos estimula a continuação da pesquisa sobre as ações da vitamina D nas disfunções do assoalho pélvico.

A vitamina D é barata, facilmente administrada e tolerada e tem sido prescrita em larga escala para a população geral, inclusive em alimentos fortificados com o hormônio. Podemos indagar se a sua administração interfere de alguma forma, negativa ou positiva, na integridade da fáscia endopélvica e, portanto, no aparecimento, aceleração ou retardo das disfunções do assoalho pélvico. Podemos indagar se a utilização da vitamina D pré e pós correção cirúrgica do prolapso poderia trazer diferentes resultados e ocorrência de recidivas. Ou se a suplementação vitamínica poderia melhorar os resultados de um tratamento conservador como fisioterapia, por exemplo. Ou ainda, se no desenvolvimento de telas autólogas enriquecidas com a vitamina ou com o seu substrato, a recuperação da função tecidual seria mais próxima do saudável.

Esta pesquisa não responde muitas dessas questões, porém simplificando etapas, trabalhando com tecidos saudáveis e dispensando o uso de testes laboratoriais ou biomecânicos, demonstrou a diferença da organização das fibras de colágeno e da apresentação de substâncias importantes para a função biomecânica em tecidos (WGA, alfa-actina e heparam sulfato) de animais sob condições diferentes de ingestão de vitamina D oral. Independente da ação estrogênica no tecido, a vitamina D promove mudanças arquiteturais na MEC; sob a ação estrogênica, a vitamina D promove alteração também na quantidade de colágeno. Primordialmente descritiva, a pesquisa justifica adicionais estudos, nesta linha, em função das possíveis implicações clínicas e cirúrgicas pelas mudanças observadas no tecido.

Durante o desenvolvimento desta pesquisa, a equipe do laboratório, onde a maioria dos experimentos foi realizada, desenvolveu um método de análise das

---

imagens capaz de determinar a orientação das fibras de colágeno nos tecidos. Esta técnica será utilizada para a criação de um modelo matemático de avaliação do padrão da disposição das fibras, o que nos permitirá um desfecho quantitativo, além do descritivo, sobre as alterações estruturais da MEC. Com esse modelo validado, será possível o cálculo do tamanho amostral para futuras pesquisas com tecido humano. Outro parâmetro essencial será a avaliação concomitante do nível sérico de 25(OH)D e tecidual da 1,25(OH)D.

---

## 7 CONCLUSÃO

---



A administração de altas doses de vitamina D por via oral altera:

- A quantidade de colágeno total (visto por microscopia com geração de segunda harmônica) e de colágeno tipo I (visto por microscopia com coloração de picrosirius) no ligamento uterossacro e tecidos adjacentes (lâmina própria e muscular) de ratas em fases do ciclo estral com alta ação estrogênica;
  - A arquitetura da matriz extracelular (visto por microscopia com geração de segunda harmônica) do ligamento uterossacro e tecidos adjacentes (lâmina própria e muscular) de ratas em fases do ciclo estral com alta ação estrogênica.
  - A expressão dos seguintes componentes:
    1. Heparan Sulfato, com maior expressão na membrana basal do epitélio vaginal de ratas em fases do ciclo estral com alta ação estrogênica;
    2. Alfa-actina, com menor expressão no córtex do citoesqueleto das células epiteliais vaginais de ratas em fases do ciclo estral com alta ação estrogênica;
    3. Glicoconjugados da membrana celular, com menor expressão nas células epiteliais vaginais de ratas em fases do ciclo estral com alta ação estrogênica, avaliados por WGA.
-



## Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



, 23 de agosto de 2016  
CEUA N 2503060715

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a): Marta Maria Kemp

Depto/Disc: Uroginecologia

Pesquisadores associados: Prof. Dra. Helena Bonciani Nader (unifesp); Renan Pelluzzi Cavalheiro (unifesp); Prof. Dr. Manoel João Batista Castello Girão (orientador)

Título do projeto: "VITAMINA D: A INFLUÊNCIA NOS TECIDOS CONECTIVOS DA Pelve E A RELAÇÃO COM O PROLAPSO GENITAL".

### Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP/HSP

A história da vitamina D teve início com as pesquisas sobre o raquitismo. Presentes em todas as células do corpo, os receptores da vitamina D oferecem às células a capacidade de gerar respostas genômicas e não genômicas a partir da transdução de sinais dando à vitamina uma imensa possibilidade de funções que envolvem desde a transcrição de proteínas com mudanças na expressão gênica até a simples ativação enzimática. Hoje o hormônio, também chamado de colecalciferol, tem algumas funções bem conhecidas no organismo humano dentre os quais a musculatura esquelética. A ação do colecalciferol na musculatura estriada e nos fibroblastos traz interesse específico aos ginecologistas pois há associação clínica comprovada entre a hipovitaminose D e a presença de disfunções do assoalho pélvico. Dallosso et al. evidenciaram o maior impacto da incontinência urinária em mulheres com hipovitaminose D, o primeiro estudo a demonstrar a associação entre o status nutricional da "vitamina" e a disfunção do assoalho pélvico. Parker-Autry et al. sugerem a importância potencial do hormônio na eficiência do músculo detrusor na função do urotélio, através da aplicação de diversos questionários e análise retrospectiva de dados. Há alguns relatos de caso de resolução de sintomas urinários com a reposição e adequação do nível sérico de colecalciferol. Estudos evidenciaram melhora da função muscular após reposição de vitamina D, em pacientes com osteomalácia, através de eletromiografia do quadríceps femoral. Muitas das disfunções pélvicas, como a incontinência urinária e o prolapso genital, estão relacionados a fraqueza muscular do assoalho além da disfunção das fâscias e ligamentos. O sistema de suspensão e sustentação das vísceras pélvicas, assim como as funções urinária e fecal, é realizado por uma interação entre fâscia endopélvica, músculos do complexo do levantador do ânus, membrana perineal, corpo perineal e músculos do períneo. O tecido conectivo é formado por fibroblastos - células de origem mesenquimal que sintetizam e secretam fibras proteicas -, envoltas em fibras - formadas basicamente por proteínas, colágeno e elastina - e matriz extracelular. Algumas mulheres com força muscular normal podem apresentar prolapso genital, evidenciando a etiologia multifatorial da enfermidade com a disfunção do tecido conectivo. Fatores nutricionais, ambientais ou genéticos podem estar relacionados. A hipovitaminose D é problema de saúde pública no mundo e, no Brasil, pode atingir 90% dos indivíduos conforme a população estudada. O presente estudo visa testar a hipótese de que a vitamina D apresenta ação específica na estrutura da matriz extra celular e no citoplasma das fâscias e ligamentos da pelve favorecendo a disfunção do assoalho quando em concentrações baixas.

Animais:

Serão utilizados:

24 ratos Wistar heterogênicos, fêmeas, 15g, 8 semanas

Procedência: Laboratório de experimentação animal do INFAR

Manutenção: Laboratório de experimentação animal do INFAR

Vigência do estudo:

Início previsto para: Junho/2016 com término previsto para: Junho/2017

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, na reunião de 16/05/2016, **ANALISOU** e **APROVOU** todos os procedimentos apresentados neste protocolo.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.

2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.

3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível



## COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



auditoria dos órgãos competentes.

4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Atenciosamente

Profa. Dra. Monica Levy Andersen  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Paulo

## 9 REFERÊNCIAS

---

1. Norman AW. The history of the discovery of vitamin D and its daughter steroid hormone. *Ann Nutr Metab.* 2012;61(3):199-206.
2. Holick MF. The photobiology of vitamin D and its consequences for humans. *Ann N Y Acad Sci.* 1985;453:1-13.
3. Holick MF. *Vitamin D: Physiology, Molecular Biology, and Clinical Applications*: Humana Press; 2010.
4. Hopkins FG. Feeding experiments illustrating the importance of accessory factors in normal dietaries. *J Physiol.* 1912;44(5-6):425-60.
5. Saskia De Pee DT, Martin W. Bloem. *Nutrition and health in a developing world*. [Place of publication not identified]: HUMANA Press; 2017.
6. Semba RD. The discovery of the vitamins. *Int J Vitam Nutr Res.* 2012;82(5):310-5.
7. Crowfoot D, Dunitz JD. Structure of calciferol. *Nature.* 1948;162(4120):608.
8. Norman AW. The mode of action of vitamin D. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 1968;43(1):97-137.
9. Norman AW, Bouillon R. Vitamin D nutritional policy needs a vision for the future. *Exp Biol Med (Maywood).* 2010;235(9):1034-45.
10. Haussler MR, Jurutka PW, Mizwicki M, Norman AW. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1 $\alpha$ ,25(OH)(2)vitamin D(3): genomic and non-genomic mechanisms. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011;25(4):543-59.
11. Plotnikoff GA, Quigley JM. Prevalence of severe hypovitaminosis D in patients with persistent, nonspecific musculoskeletal pain. *Mayo Clin Proc.* 2003;78(12):1463-70.
12. Tague SE, Clarke GL, Winter MK, McCarson KE, Wright DE, Smith PG. Vitamin D deficiency promotes skeletal muscle hypersensitivity and sensory hyperinnervation. *J Neurosci.* 2011;31(39):13728-38.
13. Sinha A, Hollingsworth KG, Ball S, Cheetham T. Improving the vitamin D status of vitamin D deficient adults is associated with improved mitochondrial oxidative function in skeletal muscle. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(3):E509-13.
14. Dhesi JK, Jackson SH, Bearne LM, Moniz C, Hurley MV, Swift CG, et al. Vitamin D supplementation improves neuromuscular function in older people who fall. *Age Ageing.* 2004;33(6):589-95.

- 
15. Gerdhem P, Ringsberg KA, Obrant KJ, Akesson K. Association between 25-hydroxy vitamin D levels, physical activity, muscle strength and fractures in the prospective population-based OPRA Study of Elderly Women. *Osteoporos Int.* 2005;16(11):1425-31.
  16. Houston DK, Cesari M, Ferrucci L, Cherubini A, Maggio D, Bartali B, et al. Association between vitamin D status and physical performance: the InCHIANTI study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2007;62(4):440-6.
  17. Wicherts IS, van Schoor NM, Boeke AJ, Visser M, Deeg DJ, Smit J, et al. Vitamin D status predicts physical performance and its decline in older persons. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(6):2058-65.
  18. Zhu K, Austin N, Devine A, Bruce D, Prince RL. A randomized controlled trial of the effects of vitamin D on muscle strength and mobility in older women with vitamin D insufficiency. *J Am Geriatr Soc.* 2010;58(11):2063-8.
  19. Vaes AMM, Brouwer-Brolsma EM, Toussaint N, de Regt M, Tieland M, van Loon LJC, et al. The association between 25-hydroxyvitamin D concentration, physical performance and frailty status in older adults. *Eur J Nutr.* 2018.
  20. Broe KE, Chen TC, Weinberg J, Bischoff-Ferrari HA, Holick MF, Kiel DP. A higher dose of vitamin d reduces the risk of falls in nursing home residents: a randomized, multiple-dose study. *J Am Geriatr Soc.* 2007;55(2):234-9.
  21. Bischoff-Ferrari HA, Dawson-Hughes B, Orav EJ, Staehelin HB, Meyer OW, Theiler R, et al. Monthly High-Dose Vitamin D Treatment for the Prevention of Functional Decline: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Intern Med.* 2016;176(2):175-83.
  22. Green M. Cod liver oil and tuberculosis. *BMJ.* 2011;343:d7505.
  23. Chun RF, Liu PT, Modlin RL, Adams JS, Hewison M. Impact of vitamin D on immune function: lessons learned from genome-wide analysis. *Front Physiol.* 2014;5:151.
  24. Rajakumar K, Holick MF, Moore CG, Cohen E, Olabopo F, Haralam MA, et al. Impact of seasonal flux on 25-hydroxyvitamin D and bone turnover in pre- and early pubertal youth. *Pediatr Int.* 2014;56(1):35-42.
  25. Marques CD, Dantas AT, Fragoso TS, Duarte AL. The importance of vitamin D levels in autoimmune diseases. *Rev Bras Reumatol.* 2010;50(1):67-80.
  26. Hypponen E, Laara E, Reunanen A, Jarvelin MR, Virtanen SM. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet.* 2001;358(9292):1500-3.
-

- 
27. Giulietti A, Gysemans C, Stoffels K, van Etten E, Decallonne B, Overbergh L, et al. Vitamin D deficiency in early life accelerates Type 1 diabetes in non-obese diabetic mice. *Diabetologia*. 2004;47(3):451-62.
  28. Pittas AG, Lau J, Hu FB, Dawson-Hughes B. The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(6):2017-29.
  29. Lenders CM, Feldman HA, Von Scheven E, Merewood A, Sweeney C, Wilson DM, et al. Relation of body fat indexes to vitamin D status and deficiency among obese adolescents. *Am J Clin Nutr*. 2009;90(3):459-67.
  30. Melamed ML, Muntner P, Michos ED, Uribarri J, Weber C, Sharma J, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and the prevalence of peripheral arterial disease: results from NHANES 2001 to 2004. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(6):1179-85.
  31. Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, Jacques PF, Ingelsson E, Lanier K, et al. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation*. 2008;117(4):503-11.
  32. Dong Y, Stallmann-Jorgensen IS, Pollock NK, Harris RA, Keeton D, Huang Y, et al. A 16-week randomized clinical trial of 2000 international units daily vitamin D3 supplementation in black youth: 25-hydroxyvitamin D, adiposity, and arterial stiffness. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(10):4584-91.
  33. Zittermann A, Schleithoff SS, Tenderich G, Berthold HK, Korfer R, Stehle P. Low vitamin D status: a contributing factor in the pathogenesis of congestive heart failure? *J Am Coll Cardiol*. 2003;41(1):105-12.
  34. Gominak SC, Stumpf WE. The world epidemic of sleep disorders is linked to vitamin D deficiency. *Med Hypotheses*. 2012;79(2):132-5.
  35. Llewellyn DJ, Lang IA, Langa KM, Muniz-Terrera G, Phillips CL, Cherubini A, et al. Vitamin D and risk of cognitive decline in elderly persons. *Arch Intern Med*. 2010;170(13):1135-41.
  36. Littlejohns TJ, Henley WE, Lang IA, Annweiler C, Beauchet O, Chaves PH, et al. Vitamin D and the risk of dementia and Alzheimer disease. *Neurology*. 2014;83(10):920-8.
  37. Patrick RP, Ames BN. Vitamin D and the omega-3 fatty acids control serotonin synthesis and action, part 2: relevance for ADHD, bipolar disorder, schizophrenia, and impulsive behavior. *FASEB J*. 2015;29(6):2207-22.
  38. Abe E, Miyaura C, Sakagami H, Takeda M, Konno K, Yamazaki T, et al. Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78(8):4990-4.
-



- 
39. Gorham ED, Garland CF, Garland FC, Grant WB, Mohr SB, Lipkin M, et al. Vitamin D and prevention of colorectal cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005;97(1-2):179-94.
  40. Garland CF, Gorham ED, Mohr SB, Grant WB, Giovannucci EL, Lipkin M, et al. Vitamin D and prevention of breast cancer: pooled analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007;103(3-5):708-11.
  41. Knight JA, Lesosky M, Barnett H, Raboud JM, Vieth R. Vitamin D and reduced risk of breast cancer: a population-based case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16(3):422-9.
  42. Lappe JM, Travers-Gustafson D, Davies KM, Recker RR, Heaney RP. Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: results of a randomized trial. *Am J Clin Nutr.* 2007;85(6):1586-91.
  43. Barreto AM, Schwartz GG, Woodruff R, Cramer SD. 25-Hydroxyvitamin D3, the prohormone of 1,25-dihydroxyvitamin D3, inhibits the proliferation of primary prostatic epithelial cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000;9(3):265-70.
  44. Krishnan AV, Peehl DM, Feldman D. Inhibition of prostate cancer growth by vitamin D: Regulation of target gene expression. *J Cell Biochem.* 2003;88(2):363-71.
  45. Vuolo L, Di Somma C, Faggiano A, Colao A. Vitamin D and cancer. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2012;3:58.
  46. Wang TT, Tavera-Mendoza LE, Laperriere D, Libby E, MacLeod NB, Nagai Y, et al. Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1,25-dihydroxyvitamin D3 target genes. *Mol Endocrinol.* 2005;19(11):2685-95.
  47. Marshall TG. Vitamin D discovery outpaces FDA decision making. *Bioessays.* 2008;30(2):173-82.
  48. Castro LCGd. O sistema endocrinológico vitamina D. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2011;55(8):566-75.
  49. Health Nlo. Vitamin D Fact Sheet for Health Professionals 2018, March 2 [Available from: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminD-HealthProfessional/>].
  50. Laboratorial SBdPCM. Posicionamento Oficial da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/ Medicina Laboratorial e da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia - Intervalos de Referência da Vitamina D – 25(OH)D - Atualização 2018 2018, abril 16 [Available from: <http://bibliotecasbpc.org.br/index.php?P=4&C=0.2>].
-

- 
51. Maeda SS, Borba VZC, Camargo MBR, Silva DMW, Borges JLC, Bandeira F, et al. Recomendações da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM) para o diagnóstico e tratamento da hipovitaminose D. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2014;58(n. 5).
  52. Saraiva GL, Cendoroglo MS, Ramos LR, Araujo LM, Vieira JG, Kunii I, et al. Influence of ultraviolet radiation on the production of 25 hydroxyvitamin D in the elderly population in the city of Sao Paulo (23 degrees 34'S), Brazil. *Osteoporos Int*. 2005;16(12):1649-54.
  53. Eloi M, Horvath DV, Szejnfeld VL, Ortega JC, Rocha DA, Szejnfeld J, et al. Vitamin D deficiency and seasonal variation over the years in Sao Paulo, Brazil. *Osteoporos Int*. 2016;27(12):3449-56.
  54. Bittar FB, Castro CHM, Szejnfeld VL. Screening for vitamin D deficiency in a tropical area: results of a sun exposure questionnaire. *BMC Endocr Disord*. 2018;18(1):44.
  55. da Rocha AK, Bos AJ, Carnenaz G, Machado DC. Bone mineral density, metabolic syndrome, and vitamin D in indigenous from south of Brazil. *Arch Osteoporos*. 2013;8:134.
  56. Chrisostomo KR, Skare TL, Kulak J, Jr., Urbanetz AA, Chrisostomo ER, Nisihara R. The prevalence and clinical associations of hypovitaminosis D in pregnant women from Brazil. *Int J Gynaecol Obstet*. 2018.
  57. Bandeira F, Griz L, Freese E, Lima DC, The AC, Diniz ET, et al. Vitamin D deficiency and its relationship with bone mineral density among postmenopausal women living in the tropics. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2010;54(2):227-32.
  58. Lips P, Wiersinga A, van Ginkel FC, Jongen MJ, Netelenbos JC, Hackeng WH, et al. The effect of vitamin D supplementation on vitamin D status and parathyroid function in elderly subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988;67(4):644-50.
  59. Van Der Klis FR, Jonxis JH, Van Doormaal JJ, Sikkens P, Saleh AE, Muskiet FA. Changes in vitamin-D metabolites and parathyroid hormone in plasma following cholecalciferol administration to pre- and postmenopausal women in the Netherlands in early spring and to postmenopausal women in Curacao. *Br J Nutr*. 1996;75(4):637-46.
  60. Mawer EB, Backhouse J, Holman CA, Lumb GA, Stanbury SW. The distribution and storage of vitamin D and its metabolites in human tissues. *Clin Sci*. 1972;43(3):413-31.
  61. Rosenstreich SJ, Rich C, Volwiler W. Deposition in and release of vitamin D3 from body fat: evidence for a storage site in the rat. *J Clin Invest*. 1971;50(3):679-87.
-

- 
62. Wacker M, Holick MF. Sunlight and Vitamin D: A global perspective for health. *Dermatoendocrinol.* 2013;5(1):51-108.
  63. Holick MF. The cutaneous photosynthesis of previtamin D3: a unique photoendocrine system. *J Invest Dermatol.* 1981;77(1):51-8.
  64. Jones G. Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. *Am J Clin Nutr.* 2008;88(2):582S-6S.
  65. Shephard RM, Deluca HF. Plasma concentrations of vitamin D3 and its metabolites in the rat as influenced by vitamin D3 or 25-hydroxyvitamin D3 intakes. *Arch Biochem Biophys.* 1980;202(1):43-53.
  66. Ekwaru JP, Zwicker JD, Holick MF, Giovannucci E, Veugelers PJ. The importance of body weight for the dose response relationship of oral vitamin D supplementation and serum 25-hydroxyvitamin D in healthy volunteers. *PLoS One.* 2014;9(11):e111265.
  67. Sanders KM, Nicholson GC, Ebeling PR. Is high dose vitamin D harmful? *Calcif Tissue Int.* 2013;92(2):191-206.
  68. Evans CD, Lacey JH. Toxicity of vitamins: complications of a health movement. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1986;292(6519):509-10.
  69. Brouwer DA, van Beek J, Ferwerda H, Brugman AM, van der Klis FR, van der Heiden HJ, et al. Rat adipose tissue rapidly accumulates and slowly releases an orally-administered high vitamin D dose. *Br J Nutr.* 1998;79(6):527-32.
  70. Swierczynski J, Nagel G, Zydowo MM. Calcium content in some organs of rats treated with a toxic calciol dosis. *Pharmacology.* 1987;34(1):57-60.
  71. Haylen BT, de Ridder D, Freeman RM, Swift SE, Berghmans B, Lee J, et al. An International Urogynecological Association (IUGA)/International Continence Society (ICS) joint report on the terminology for female pelvic floor dysfunction. *Neurourol Urodyn.* 2010;29(1):4-20.
  72. Dallosso HM, McGrother CW, Matthews RJ, Donaldson MM, Leicestershire MRCISG. The association of diet and other lifestyle factors with overactive bladder and stress incontinence: a longitudinal study in women. *BJU Int.* 2003;92(1):69-77.
  73. Dallosso HM, McGrother CW, Matthews RJ, Donaldson MM, Leicestershire MRCISG. Nutrient composition of the diet and the development of overactive bladder: a longitudinal study in women. *Neurourol Urodyn.* 2004;23(3):204-10.
  74. Alkhatib AA, Tuteja AK. High prevalence of vitamin D deficiency among patients with fecal incontinence. *Dig Dis Sci.* 2010;55(12):3632-3.
-

- 
75. Badalian SS, Rosenbaum PF. Vitamin D and pelvic floor disorders in women: results from the National Health and Nutrition Examination Survey. *Obstet Gynecol.* 2010;115(4):795-803.
  76. Parker-Autry CY, Markland AD, Ballard AC, Downs-Gunn D, Richter HE. Vitamin D status in women with pelvic floor disorder symptoms. *Int Urogynecol J.* 2012;23(12):1699-705.
  77. Vaughan CP, Tangpricha V, Motahar-Ford N, Goode PS, Burgio KL, Allman RM, et al. Vitamin D and incident urinary incontinence in older adults. *Eur J Clin Nutr.* 2016;70(9):987-9.
  78. Gau JT. Urinary incontinence resolved after adequate vitamin D supplementation: a report of two cases. *J Am Geriatr Soc.* 2010;58(12):2438-9.
  79. Sharma SG, N.; Madhu, S.V.; Rajaram, S.; Sharma, S. Serum elastin and 25 hydroxyvitamin D levels in women with pelvic organ prolapse. *Journal, Indian Academy of Clinical Medicine.* 2013;14:3-4.
  80. Kaur H, Bala R, Nagpal M. Role of Vitamin D in urogenital health of geriatric participants. *J Midlife Health.* 2017;8(1):28-35.
  81. Haylen BT, de Ridder D, Freeman RM, Swift SE, Berghmans B, Lee J, et al. An International Urogynecological Association (IUGA)/International Continence Society (ICS) joint report on the terminology for female pelvic floor dysfunction. *Int Urogynecol J.* 2010;21(1):5-26.
  82. Petros P. The Female Pelvic Floor Function, Dysfunction and Management According to the Integral Theory. Patros P, editor. Germany: Springer Medizin Verlag; 2007.
  83. Barber MD, Maher C. Epidemiology and outcome assessment of pelvic organ prolapse. *Int Urogynecol J.* 2013;24(11):1783-90.
  84. Kase NG, Weingold AB. Principles and practice of clinical gynecology. Kase NG, Weingold AB, Gershenson DM, editors. Michigan: Churchill Livingstone; 1983.
  85. Denman MA, Gregory WT, Boyles SH, Smith V, Edwards SR, Clark AL. Reoperation 10 years after surgically managed pelvic organ prolapse and urinary incontinence. *Am J Obstet Gynecol.* 2008;198(5):555 e1-5.
  86. Fialkow MF, Newton KM, Weiss NS. Incidence of recurrent pelvic organ prolapse 10 years following primary surgical management: a retrospective cohort study. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.* 2008;19(11):1483-7.
  87. Girão M, Sartori MG, Ribeiro R, Catro R, Járrmy-Di Bella Z. Uroginecologia e Disfunções do Assoalho Pélvico. São Paulo, Brasil: Editora Manole; 2015.
-

- 
88. Cundiff GW. Anatomy of The Pelvic Viscera. In: Bent AE, Cundiff GW, E. SS, editors. *Ostergard's Urogynecology and Pelvic Floor Dysfunction*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 3-26.
  89. DeLancey JO. Anatomic aspects of vaginal eversion after hysterectomy. *Am J Obstet Gynecol*. 1992;166(6 Pt 1):1717-24; discussion 24-8.
  90. Ercoli A, Delmas V, Fanfani F, Gadonneix P, Ceccaroni M, Fagotti A, et al. Terminologia Anatomica versus unofficial descriptions and nomenclature of the fasciae and ligaments of the female pelvis: a dissection-based comparative study. *Am J Obstet Gynecol*. 2005;193(4):1565-73.
  91. Bischoff HA, Borchers M, Gudat F, Duermueller U, Theiler R, Stahelin HB, et al. In situ detection of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in human skeletal muscle tissue. *Histochem J*. 2001;33(1):19-24.
  92. Bischoff-Ferrari HA, Borchers M, Gudat F, Durmuller U, Stahelin HB, Dick W. Vitamin D receptor expression in human muscle tissue decreases with age. *J Bone Miner Res*. 2004;19(2):265-9.
  93. Ceglia L, Niramitmahapanya S, da Silva Morais M, Rivas DA, Harris SS, Bischoff-Ferrari H, et al. A randomized study on the effect of vitamin D(3) supplementation on skeletal muscle morphology and vitamin D receptor concentration in older women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(12):E1927-35.
  94. Omelyanenko NP, Slutsky LI, Mironov SP. Peculiarities of connective tissue histopathology, biochemistry and molecular biology. In: Mironov SP, editor. *Connective Tissue Histopathology, Biochemistry, Molecular Biology*. Florida: CRC Press; 2017. p. 1-15.
  95. McCullagh KG. The effect of experimental renal hypertension on the response of the rabbit aorta to vitamin D. *Br J Exp Pathol*. 1973;54(2):173-82.
  96. Artaza JN, Norris KC. Vitamin D reduces the expression of collagen and key profibrotic factors by inducing an antifibrotic phenotype in mesenchymal multipotent cells. *J Endocrinol*. 2009;200(2):207-21.
  97. Andrukhova O, Slavic S, Zeitz U, Riesen SC, Heppelmann MS, Ambrisko TD, et al. Vitamin D is a regulator of endothelial nitric oxide synthase and arterial stiffness in mice. *Mol Endocrinol*. 2014;28(1):53-64.
  98. Dorsch MP, Nemerovski CW, Ellingrod VL, Cowger JA, Dyke DB, Koelling TM, et al. Vitamin D receptor genetics on extracellular matrix biomarkers and hemodynamics in systolic heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2014;19(5):439-45.
  99. Sabry D, Al-Ghusein MA, Hamdy G, Abul-Fotouh A, Motawi T, El Kazaz AY, et al. Effect of vitamin D therapy on interleukin-6, visfatin, and hyaluronic acid levels in chronic hepatitis C Egyptian patients. *Ther Clin Risk Manag*. 2015;11:279-88.
-

- 
100. Tomasini-Johansson B, O'Brien C, Larson-Osborne A, Toraason I, Hullett D, Plum L, et al. Effects of the Vitamin D Analog 2AMD in Cyclosporine-Induced Nephrotoxicity: Dose-Response and Antifibrotic Activity. *Exp Clin Transplant*. 2017;15(6):641-7.
  101. Yildirim B, Abban G, Erdogan BS. Immunohistochemical detection of 1,25-dihydroxyvitamin D receptor in rat vaginal epithelium. *Fertil Steril*. 2004;82(6):1602-8.
  102. Johnson JA, Grande JP, Roche PC, Kumar R. Immunohistochemical detection and distribution of the 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor in rat reproductive tissues. *Histochem Cell Biol*. 1996;105(1):7-15.
  103. Abban G, Yildirim NB, Jetten AM. Regulation of the vitamin D receptor and cornifin beta expression in vaginal epithelium of the rats through vitamin D<sub>3</sub>. *Eur J Histochem*. 2008;52(2):107-14.
  104. Kim TH, Lee HH, Park J. Immunohistochemical detection of the 1,25-dihydroxy vitamin D receptor in the human vagina. *Iran J Reprod Med*. 2014;12(12):805-10.
  105. Rad P, Tadayon M, Abbaspour M, Latifi SM, Rashidi I, Delaviz H. The effect of vitamin D on vaginal atrophy in postmenopausal women. *Iran J Nurs Midwifery Res*. 2015;20(2):211-5.
  106. Bala R, Kaur H, Nagel G. Authenticity of vitamin D in modified vaginal health index in geriatric subjects. *International Journal of Reproduction, Contraception, Obstetrics and Gynecology*. 2016;5(12):4119-22.
  107. Lee A, Lee MR, Lee HH, Kim YS, Kim JM, Enkhbold T, et al. Vitamin D Proliferates Vaginal Epithelium through RhoA Expression in Postmenopausal Atrophic Vagina tissue. *Mol Cells*. 2017;40(9):677-84.
  108. Sampaio LO, Nader HB. Emergence and structural characteristics of chondroitin sulfates in the animal kingdom. *Adv Pharmacol*. 2006;53:233-51.
  109. Mao M, Alavi MV, Labelle-Dumais C, Gould DB. Type IV collagens and Basement Membrane Diseases: Cell Biology and Pathogenic Mechanisms. *Curr Top Membr*. 2015;76:61-116.
  110. Souza RSD, Pinhal MADS. Interações em processos fisiológicos: a importância da dinâmica entre matriz extracelular e proteoglicanos. *Arq. Bras. Clín. Saúde*. 2011;36(1).
  111. Kaku M, Yamauchi M. Mechano-regulation of collagen biosynthesis in periodontal ligament. *J Prosthodont Res*. 2014;58(4):193-207.
-

- 
112. Wang S, Zhang Z, Lu D, Xu Q. Effects of mechanical stretching on the morphology and cytoskeleton of vaginal fibroblasts from women with pelvic organ prolapse. *Int J Mol Sci*. 2015;16(5):9406-19.
  113. Jean-Charles C, Rubod C, Brieu M, Boukerrou M, Fasel J, Cosson M. Biomechanical properties of prolapsed or non-prolapsed vaginal tissue: impact on genital prolapse surgery. *Int Urogynecol J*. 2010;21(12):1535-8.
  114. Zhou L, Lee JH, Wen Y, Constantinou C, Yoshinobu M, Omata S, et al. Biomechanical properties and associated collagen composition in vaginal tissue of women with pelvic organ prolapse. *J Urol*. 2012;188(3):875-80.
  115. Feola A, Duerr R, Moalli P, Abramowitch S. Changes in the rheological behavior of the vagina in women with pelvic organ prolapse. *Int Urogynecol J*. 2013;24(7):1221-7.
  116. Martins P, Lopes Silva-Filho A, Rodrigues Maciel da Fonseca AM, Santos A, Santos L, Mascarenhas T, et al. Biomechanical properties of vaginal tissue in women with pelvic organ prolapse. *Gynecol Obstet Invest*. 2013;75(2):85-92.
  117. Zong W, Jallah ZC, Stein SE, Abramowitch SD, Moalli PA. Repetitive mechanical stretch increases extracellular collagenase activity in vaginal fibroblasts. *Female Pelvic Med Reconstr Surg*. 2010;16(5):257-62.
  118. Fede C, Angelini A, Stern R, Macchi V, Porzionato A, Ruggieri P, et al. Quantification of hyaluronan in human fasciae: variations with function and anatomical site. *J Anat*. 2018;233(4):552-6.
  119. Ferreira TM, Medeiros MG, Dietrich CP, Nader HB. Structure of heparan sulfate from the fresh water mollusc *Anomantidae* sp: sequencing of its disaccharide units. *Int J Biochem*. 1993;25(9):1219-25.
  120. Dreyfuss, JL, Regatieri CV, Jarrouge TR, Cavalheiro RP, Sampaio LO, Nader HB. Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signalling. *An Acad Bras Cienc*. 2009;81(3):409-29.
  121. Pankov R, Yamada KM. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci*. 2002;115(Pt 20):3861-3.
  122. Franco CR, Trindade ES, Rocha HA, da Silveira RB, Paludo KS, Chammas R, et al. Glycosaminoglycan chains from alpha5beta1 integrin are involved in fibronectin-dependent cell migration. *Biochem Cell Biol*. 2009;87(4):677-86.
  123. Kostrominova TY. Application of WGA lectin staining for visualization of the connective tissue in skeletal muscle, bone, and ligament/tendon studies. *Microsc Res Tech*. 2011;74(1):18-22.
-

- 
124. Cavalcheiro RP, Lima MA, Jarrouge-Boucas TR, Viana GM, Lopes CC, Coulson-Thomas VJ, et al. Coupling of vinculin to F-actin demands Syndecan-4 proteoglycan. *Matrix Biol.* 2017;63:23-37.
  125. Coulombe PA, Ma L, Yamada S, Wawersik M. Intermediate filaments at a glance. *J Cell Sci.* 2001;114(Pt 24):4345-7.
  126. Stevenson RP, Veltman D, Machesky LM. Actin-bundling proteins in cancer progression at a glance. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 5):1073-9.
  127. Omelyanenko NP, Slutsky LI, Mironov SP. Extracellular matrix of connective tissue. Histopathology, Biochemistry and Molecular biology. In: Mironov SP, editor. *Connective Tissue Histopathology, Biochemistry, Molecular Biology.* Florida: CRC Press; 2017. p. 79-189.
  128. Benias PC, Wells RG, Sackey-Aboagye B, Klavan H, Reidy J, Buonocore D, et al. Structure and Distribution of an Unrecognized Interstitium in Human Tissues. *Sci Rep.* 2018;8(1):4947.
  129. Langevin HM, Storch KN, Cipolla MJ, White SL, Buttolph TR, Taatjes DJ. Fibroblast spreading induced by connective tissue stretch involves intracellular redistribution of alpha and beta-actin. *Histochem Cell Biol.* 2006;125(5):487-95.
  130. Langevin HM, Bouffard NA, Fox JR, Palmer BM, Wu J, Iatridis JC, et al. Fibroblast cytoskeletal remodeling contributes to connective tissue tension. *J Cell Physiol.* 2011;226(5):1166-75.
  131. Stecco C, Porzionato A, Macchi V, Stecco A, Vigato E, Parenti A, et al. The expansions of the pectoral girdle muscles onto the brachial fascia: morphological aspects and spatial disposition. *Cells Tissues Organs.* 2008;188(3):320-9.
  132. Stecco A, Macchi V, Stecco C, Porzionato A, Ann Day J, Delmas V, et al. Anatomical study of myofascial continuity in the anterior region of the upper limb. *J Bodyw Mov Ther.* 2009;13(1):53-62.
  133. Stecco A, Masiero S, Macchi V, Stecco C, Porzionato A, De Caro R. The pectoral fascia: anatomical and histological study. *J Bodyw Mov Ther.* 2009;13(3):255-61.
  134. Conklin MW, Eickhoff JC, Riching KM, Pehlke CA, Eliceiri KW, Provenzano PP, et al. Aligned collagen is a prognostic signature for survival in human breast carcinoma. *Am J Pathol.* 2011;178(3):1221-32.
  135. Moalli PA, Talarico LC, Sung VW, Klingensmith WL, Shand SH, Meyn LA, et al. Impact of menopause on collagen subtypes in the arcus tendineous fasciae pelvis. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;190(3):620-7.
-



- 
136. Moalli PA, Shand SH, Zyczynski HM, Gordy SC, Meyn LA. Remodeling of vaginal connective tissue in patients with prolapse. *Obstet Gynecol*. 2005;106(5 Pt 1):953-63.
  137. Sridharan I, Ma Y, Kim T, Kobak W, Rotmensch J, Wang R. Structural and mechanical profiles of native collagen fibers in vaginal wall connective tissues. *Biomaterials*. 2012;33(5):1520-7.
  138. Barbiero EC, Sartori MG, Girao MJ, Baracat EC, de Lima GR. Analysis of type I collagen in the parametrium of women with and without uterine prolapse, according to hormonal status. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*. 2003;14(5):331-4; discussion 4.
  139. Makinen J, Soderstrom KO, Kiilholma P, Hirvonen T. Histological changes in the vaginal connective tissue of patients with and without uterine prolapse. *Arch Gynecol*. 1986;239(1):17-20.
  140. Kim T, Sridharan I, Ma Y, Zhu B, Chi N, Kobak W, et al. Identifying distinct nanoscopic features of native collagen fibrils towards early diagnosis of pelvic organ prolapse. *Nanomedicine*. 2016;12(3):667-75.
  141. Badiou W, Granier G, Bousquet PJ, Monrozies X, Mares P, de Tayrac R. Comparative histological analysis of anterior vaginal wall in women with pelvic organ prolapse or control subjects. A pilot study. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*. 2008;19(5):723-9.
  142. Boreham MK, Wai CY, Miller RT, Schaffer JI, Word RA. Morphometric analysis of smooth muscle in the anterior vaginal wall of women with pelvic organ prolapse. *Am J Obstet Gynecol*. 2002;187(1):56-63.
  143. Abramowitch SD, Feola A, Jallah Z, Moalli PA. Tissue mechanics, animal models, and pelvic organ prolapse: a review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2009;144 Suppl 1:S146-58.
  144. Couri BM, Lenis AT, Borazjani A, Paraiso MF, Damaser MS. Animal models of female pelvic organ prolapse: lessons learned. *Expert Rev Obstet Gynecol*. 2012;7(3):249-60.
  145. Storer JB. Longevity and gross pathology at death in 22 inbred mouse strains. *J Gerontol*. 1966;21(3):404-9.
  146. Festing MF, Blackmore DK. Life span of specified-pathogen-free (MRC category 4) mice and rats. *Lab Anim*. 1971;5(2):179-92.
  147. Moalli PA, Howden NS, Lowder JL, Navarro J, Debes KM, Abramowitch SD, et al. A rat model to study the structural properties of the vagina and its supportive tissues. *Am J Obstet Gynecol*. 2005;192(1):80-8.
-

- 
148. Iwanaga R, Orlicky DJ, Arnett J, Guess MK, Hurt KJ, Connell KA. Comparative histology of mouse, rat, and human pelvic ligaments. *Int Urogynecol J*. 2016;27(11):1697-704.
  149. Mostaco-Guidolin L, Rosin NL, Hackett TL. Imaging Collagen in Scar Tissue: Developments in Second Harmonic Generation Microscopy for Biomedical Applications. *Int J Mol Sci*. 2017;18(8).
  150. Masaru Suzuki DK, W. Mark Elliott, James C. Hogg, Thomas Abraham. Second Harmonic Generation Microscopy Differentiates Collagen Type I and Type III in COPD. *Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences*. 2012;8226(82263F).
  151. Khosravi ZS, Kafeshani M, Tavasoli P, Zadeh AH, Entezari MH. Effect of Vitamin D Supplementation on Weight Loss, Glycemic Indices, and Lipid Profile in Obese and Overweight Women: A Clinical Trial Study. *Int J Prev Med*. 2018;9:63.
  152. Kerkhof MH, Ruiz-Zapata AM, Bril H, Bleeker MC, Belien JA, Stoop R, et al. Changes in tissue composition of the vaginal wall of premenopausal women with prolapse. *Am J Obstet Gynecol*. 2014;210(2):168 e1-9.
  153. de Landsheere L, Blacher S, Munaut C, Nusgens B, Rubod C, Noel A, et al. Changes in elastin density in different locations of the vaginal wall in women with pelvic organ prolapse. *Int Urogynecol J*. 2014;25(12):1673-81.
  154. Graham HK, Hodson NW, Hoyland JA, Millward-Sadler SJ, Garrod D, Scothern A, et al. Tissue section AFM: In situ ultrastructural imaging of native biomolecules. *Matrix Biol*. 2010;29(4):254-60.
  155. Xu X, Ding J, Rao G, Shen J, Prinz RA, Rana N, et al. Estradiol induces heparinase-1 expression and heparan sulphate proteoglycan degradation in human endometrium. *Hum Reprod*. 2007;22(4):927-37.
  156. Garsen M, Sonneveld R, Rops AL, Huntink S, van Kuppevelt TH, Rabelink TJ, et al. Vitamin D attenuates proteinuria by inhibition of heparanase expression in the podocyte. *J Pathol*. 2015;237(4):472-81.
-